

ALINE SIMONETI FONSECA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DO ENVOLVIMENTO DO CROMOSSOMO 1 EM
PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA DE FANCONI**

**Monografia apresentada ao Departamento de
Genética do Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná, para obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biológicas.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Enilze Maria de S. F.
Ribeiro**

**CURITIBA
2004**

AGRADECIMENTOS

À Prof Dra Enilze M.S.F. Ribeiro pelo auxílio como professora e como orientadora no decorrer deste trabalho (e outros também!), na correção dos cariogramas e principalmente na exaustiva correção da redação deste texto.

Ao Prof Dr Iglénir João Cavalli pelos incentivos não apenas profissionais mas também pessoais, com certeza pela grande ajuda na realização deste trabalho, mas principalmente por nossas "viagens filosóficas".

À minha grande amiga Guaracira que consegue compreender minhas ansiedades, minhas lutas, etc, pois divide um espírito semelhante ao meu.

Às citogeneticistas da Unidade de Citogenética do Laboratório de Imunogenética do HC. Em especial à Loraine Veiga, Néria Maia, Roseli e à Profa. Neide Oliveira pela colaboração técnica neste trabalho.

Aos meus pais que ficaram ao meu lado em todos os momentos, que aguentaram meus dias de mau humor e que sempre me incentivaram a acreditar que apesar de muita luta é possível chegar aonde se quer.

Ao meu irmão que muito me ajudou (apesar das brigas) quando o assunto foi o computador.

Ao meu namorado que aceitou passar alguns finais de semana sem me ver, que também aguentou meus dias negros e que ainda assim continua a me incentivar.

E a todos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho, em especial a turminha do Laboratório de Citogenética Humana.

MUITO OBRIGADA

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

I. INTRODUÇÃO	1
I.2. ETIOPATOGENIA DA AF	4
I.3. ASPECTOS GENÉTICOS E MOLECULARES DA AF	5
I.3.1. Grupos de Complementação.....	5
I.3.1.1. Nomenclatura.....	9
I.3.1.2. Freqüência dos Grupos de Complementação.....	8
I.4. DIAGNÓSTICO	12
I.4.1. Citogenético.....	12
I.4.2. Clínico.....	14
I.4.3. Molecular.....	14
I.5. TRATAMENTO	15
I.6. ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM AF	16
II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	23
III. MATERIAL E MÉTODOS	24
III.1. AMOSTRA	24
III.2. COLETA, CULTURA, PREPARAÇÃO CITOLÓGICA E ANÁLISE CITOGENÉTICA EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA	24
III.2.1. Coleta das Amostras.....	24
III.2.2. Cultura e Preparação Citológica.....	25
III.2.3. Bandeamento Cromossômico GTG.....	26
III.2.4. Análise Cromossômica e Obtenção dos Negativos.....	26
III.2.5. Análise Estatística.....	26
IV. RESULTADOS	28
V. DISCUSSÃO	40
VI. CONCLUSÕES	44
VII. REFERÊNCIAS	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Proteínas FANC envolvidas no reparo do DNA.....	9
Figura 2: Metáfase de um paciente com AF demonstrando quebras (a) e figuras radiais (b).....	13
Figura 3: Cariograma contendo a dup(1)(q12q32) observada no paciente 1.....	29
Figura 4: Cariogramas parciais com a dup(1)(q12q32) observada no paciente 1.....	30
Figura 5: Cariogramas parciais com a t(5;5)(q13q35) observada no paciente 1.....	30
Figura 6: Cariograma com a dup(1)(q21q32) observada no paciente 2.....	31
Figura 7: Cariogramas parciais com a dup(1)(q21q32) observada no paciente 2.....	32
Figura 8: Cariograma com a trp(1)(q21q43) e monossomias clonais dos cromossomos 11 e 20 observadas no paciente 3.....	34
Figura 9: Cariograma com a trp(1)(q21q43) e monossomias clonais dos cromossomos 11 e 20 observadas no paciente 3.....	35
Figura 10: Cariograma com dup(1)(p11p32) e del(5)(q13q33) observada no paciente 4.....	36
Figura 11: Cariogramas parciais contendo a dup(1)(p11p32) observadas no paciente 4.....	37
Figura 12: Cariograma com del(1)(q32) observada no paciente 5.....	38
Figura 13: Cariograma com dup(1)(q21q42) observada no paciente 5.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequência de anormalidades em pacientes com AF.....	3
Tabela 2: Caracterização dos genes da Anemia de Fanconi.....	10
Tabela 3: Aberrações cromossômicas clonais em 64 pacientes com Anemia de Fanconi descritos na literatura.....	21
Tabela 4: Número de aberrações cromossômicas clonais observado em 13 pacientes com AF.....	28

RESUMO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença autossômica recessiva caracterizada por pancitopenia progressiva, diversas malformações congênitas e predisposição às neoplasias, principalmente leucemia mielóide aguda (LMA). O diagnóstico clínico é difícil, devido à grande variabilidade fenotípica, sendo necessária a confirmação citogenética, com adição de agentes alquilantes à cultura celular que induzem o aumento do número de quebras e formação de figuras radiais características da doença. Neste estudo, de 36 pacientes analisados citogeneticamente, 13 apresentavam aberrações cromossômicas clonais, dos quais cinco as apresentavam no cromossomo 1 e foram selecionados para uma análise citogenética detalhada de acordo com os objetivos desse trabalho. A coleta do material foi realizada no Ambulatório de Hematologia ou Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da UFPR. Para a obtenção dos cromossomos metafásicos de células da medula óssea foi utilizado o método descrito por WILLIAMS et al. (1984), com modificações, e analisados através do bandeamento GTG utilizando a técnica de SCHERES (1972), com modificações. Nos 13 pacientes com aberrações cromossômicas clonais, as do 1 (5/13 – 38,5%) foram as mais frequentes. Das 36 aberrações cromossômicas clonais observadas, as do 1 (10) foram igualmente as mais frequentes (28%). As aberrações cromossômicas não ocorreram ao acaso nos cromossomos que as apresentaram ($\chi^2_{15} = 622,08$; $P < 0,001$). Estas informações demonstram a importância do cromossomo 1 na Anemia de Fanconi. Os pontos de quebra observados nas diferentes aberrações cromossômicas coincidiram, em geral, com os descritos na literatura e nos mesmos são identificados importantes genes envolvidos na carcinogênese humana. A ocorrência de diferentes aberrações cromossômicas em diferentes fases da doença pode resultar de um epifenômeno relacionado ao número de células analisadas, com significado prognóstico não definido.

I. INTRODUÇÃO

A Anemia de Fanconi (AF) foi primeiramente descrita por Guido Fanconi em 1927 (citado por FANCONI, 1967), em um estudo envolvendo três irmãos que apresentavam anemia aplástica de evolução rápida e fatal, malformações esqueléticas, retardo do crescimento, hipogonadismo, microcefalia e manchas hiperpigmentadas na pele. O diagnóstico clínico foi o de uma anemia perniciosa, devido à morfologia dos eritrócitos. Entretanto, a análise da medula óssea revelou que, além do comprometimento morfológico da série vermelha, ela era atrófica e com poucos focos de hematopoese, sendo proposto, então, o nome de anemia perniciosiforme.

Em 1929, Uehlinger (citado por FANCONI, 1967) sugeriu o nome de panmielocitopatia hipoplástica familiar porque, além dos três irmãos descritos por Fanconi, um quarto caso apresentava leucopenia, trombocitopenia e também malformações dos polegares e dos rins.

O termo Anemia de Fanconi foi introduzido por Naegeli em 1931 (citado por FANCONI, 1967), que sugeriu que o mesmo fosse empregado naqueles pacientes com anemia aplástica familiar associada a anormalidades físicas congênitas.

Baseado no fato de que nas famílias estudadas poucos filhos eram afetados e na incidência de consangüinidade entre os pais, admitiu-se um padrão de herança autossômica recessiva. Porém, várias evidências eram contra este tipo de herança, entre elas: a variabilidade de sintomas e malformações congênitas, a diferença na idade de início das manifestações hematológicas e o fato da frequência de leucemias e outras mielodisplasias (MDS), nestas famílias, serem maiores do que na população em geral. Estas características, somente foram entendidas após a

elucidação da heterogeneidade genotípica da AF e a susceptibilidade aos agentes alquilantes que induzem ligações cruzadas ("cross-linking") com a molécula de DNA. O padrão de herança autossômico recessivo da AF foi confirmado pelos estudos de análise de segregação em 90 famílias, realizado por SCHROEDER et al. (1976) e de 88 pacientes do IFAR (*International Fanconi Anemia Registry*) realizado por ROGATKO e AUERBACH (1988).

Desde a descoberta da doença por Guido Fanconi, mais de 900 casos já foram descritos, permitindo que a doença fosse mais claramente compreendida. (TISCHKOWITZ e HODGSON, 2003).

A AF é uma doença autossômica recessiva na qual a maioria dos pacientes apresenta na primeira década de vida uma falência generalizada na medula óssea (pancitopenia) e câncer, particularmente, leucemia mielóide aguda (LMA) e carcinomas de células escamosas, geralmente de cabeça e pescoço. A maioria dos indivíduos afetados, apresentam também uma ou mais anormalidades congênitas incluindo retardo no crescimento, alterações na pele (manchas de coloração café com leite ou despigmentação), esquelética (microcefalia, polegares ausentes, hipoplasia radial, escoliose), genitourinário (hipogonadismo, rins em forma de ferradura), gastrointestinal e anomalias cardíacas e neurológicas (DOKAL, 2000).

Estas características são bastante variáveis nos pacientes com AF, tanto quanto à gravidade, presença e tipo de malformações congênitas (tabela 1) como na idade de início das manifestações hematológicas (NILSSON, 1960; DACIE e GILPIN, 1994; AUERBACH et al., 1998). No nascimento a contagem sanguínea é geralmente normal e a macrocitose é geralmente a primeira anormalidade detectada seguida por trombocitopenia e neutropenia. A pancitopenia está tipicamente

presente entre as idades de cinco e 10 anos, com uma média de início por volta de sete anos de idade (AUERBACH e ALLEN, 1991; BUTTURINI, 1994).

Tabela 1 - Frequência de anormalidades em pacientes com AF

Anormalidade	Frequência(%)
Esquelética (raio radial, quadril, escoliose vertebral, costela)	71
Pigmentação da pele (café com leite, hiper- e hipopigmentação)	64
Baixa estatura	63
Microftalmia	38
Trato renal e urinário	34
Orgão genital masculino	20
Retardo mental	16
Gastrointestinal (anorectal, atresia duodenal)	14
Anormalidades cardíacas	13
Déficit na audição	11
Sistema nervoso central (hidrocefalia, septum pellucidum)	8
Nenhuma anormalidade	30

Fonte: DOKAL, 2000

A incidência da AF é de aproximadamente três por milhão e a frequência de heterozigotos está estimada em um por 300 na Europa e Estados Unidos. A doença afeta todos os grupos étnicos incluindo caucasóides, negróides, asiáticos, hispânicos, índios asiáticos e ameríndios (SWIFT, 1971; SCHROEDER et al., 1976; ROSENDORFF et al., 1987; VERLANDER et al., 1995).

Em um estudo realizado em 388 pacientes com AF foi calculado o risco de desenvolvimento de anormalidades hematopoéticas e morte por causas hematológicas na faixa dos 40 anos de idade e o resultado foi de 98% e 81% respectivamente (BUTTURINI et al., 1994). O risco de pancitopenia foi de 84% aos 20 anos de idade, seguido por anormalidades citogenéticas clonais (risco de 67% aos 30 anos de idade) e MDS ou LMA (risco de 52% aos 40 anos) (AUERBACH e ALLEN, 1991).

A AF foi a primeira doença associada à presença de quebras cromossômicas espontâneas na cultura de linfócitos (SCHROEDER et al., 1964). Estes autores analisando citogeneticamente dois irmãos afetados, detectaram em mais de 40% das metáfases analisadas rearranjos e quebras cromossômicas. Posteriormente SCHROEDER e GERMAN (1974) e DOSIK et al. (1979) demonstraram que as alterações mais freqüentes são as quebras de cromátides, quebras de isocromátides, figuras tri ou tetra-radiais e endorreduplicações.

I.2. ETIOPATOGENIA DA AF

Além dos defeitos no mecanismo de reparo do DNA, outras anormalidades podem ser encontradas em pacientes com AF como o prolongamento da transição G2/M do ciclo celular, o aumento da sensibilidade celular ao oxigênio, regulação anormal da apoptose (morte celular programada), o defeito na manutenção do telômero (altas taxas de quebras teloméricas) e problemas hematopoéticos como, por exemplo, alterações nos níveis de fatores de crescimento (DUTRILLAUX et al., 1982; JOENJE et al., 1981; ROSSELI et al., 1992; STARK et al., 1993; ROSSELLI, 1998; CALLEN et al., 2002).

As células dos pacientes com AF mostram crescimento lento em cultura e uma fragilidade cromossômica caracterizada tanto por aumento espontâneo na taxa de quebras cromossômicas como pelo aumento da sensibilidade do DNA a agentes promotores de ligações cruzadas, tais como a mitomicina C (MMC) e diepoxibutano (DEB) (AUERBACH e WOLMAN, 1976; MEDHURST et al., 2001).

No ciclo celular, a transição G2/M é prolongada em células de portadores de AF com conseqüente diminuição de células em divisão e morte celular

(DUTRILLAUX et al., 1982; ISHIDA e BUCHWALD, 1982), e este processo é aumentado se as células são expostas a agentes promotores de ligação cruzada ou altas concentrações de oxigênio. A exposição aos agentes alquilantes, também induz aberrações cromossômicas como quebras e rearranjos (HOEHN et al., 1989). Molecularmente, ocorre a formação de ligações cruzadas na dupla hélice do DNA, tanto inter como intra-fita, o que leva a um bloqueio da replicação e transcrição, com efeitos potenciais na sobrevivência e função celular (LIU et al., 1994).

As quebras ocorrem casualmente em todos os cromossomos do genoma, porém, as mesmas são observadas preferencialmente nas bandas G claras e sítios frágeis (KOSKULL e AULA, 1973; PORFIRIO et al., 1991). FUNDIA et al. (1994), por exemplo, detectaram cinco bandas localizadas em: 1p36; 1p22; 1q21; 3p14 e 3q21 que são coincidentes com locais de quebras envolvidas no câncer, sendo que quatro destas bandas (80%) localizadas em 1p36; 1q21; 3p14 e 3q21 foram associadas com locais de quebras presentes na leucemia mieloide aguda (LMA).

I.3. ASPECTOS GENÉTICOS E MOLECULARES DA AF

I.3.1. GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO

A variabilidade no quadro clínico, tanto anatômico como fisiológico, observada nos pacientes com AF, a instabilidade cromossômica e a susceptibilidade aos agentes clastogênicos, indicaram a heterogeneidade desta doença (SCHROEDER et al., 1964; FANCONI, 1967; GERMAN, 1972; SCHROEDER et al., 1976). ZAKRZEWSKI e SPERLING (1980) fundiram células somáticas de diferentes pacientes com AF e utilizaram um controle normal, analisando os híbridos

citogeneticamente em relação à susceptibilidade à MMC. A complementação (indicando heterogeneidade) levaria a uma quantidade normal de danos cromossômicos induzidos pela mitomicina C. Esta mesma linha de raciocínio levou vários pesquisadores (DUCKWORTH-RYSIECKI et al., 1985; STRATHDEE et al., 1992; SANTOS et al., 1994; JOENJE et al., 1995) a obterem a fusão de células de pacientes com AF, observando que, quando linhagens celulares linfoblásticas derivadas de pacientes não consangüíneos são fundidas, são obtidas células híbridas que mostram resistência às substâncias clastogênicas (complementação) ou células híbridas que continuam a ser sensíveis a estas substâncias (ausência de complementação). Os pacientes cujas linhagens celulares se complementam, pertencem a grupos de complementação diferentes, e aqueles cujas linhagens celulares não se complementam pertencem ao mesmo grupo de complementação. Estas pesquisas levaram à definição de cinco grupos de complementação (A a E), indicando a existência de pelo menos cinco genes que poderiam levar à AF.

JOENJE et al. (1997), sugeriram a existência de pelo menos mais três grupos de complementação (F, G e H), elevando para oito o número provável de genes envolvidos na AF. Estes pesquisadores introduziram marcadores selecionados em uma linhagem celular *FANCE* (com o grupo de complementação E, previamente identificado) e analisaram híbridos de fusão com três linhagens celulares classificadas como não ABCD. Todos os híbridos foram complementados para sensibilidade aos agentes alquilantes, indicando não se tratar do grupo E. As três linhagens foram então marcadas e todas as possíveis combinações híbridas para complementação foram examinadas, indicando que cada linhagem celular individual representava um novo grupo de complementação, denominados de F, G e H. Posteriormente, o grupo de complementação designado *FANCH* foi identificado por

JOENJE et al. (2000) como sendo o *FANCA*, decrescendo, portanto, para sete o número provável de genes responsáveis pela AF. TIMMERS et al. (2001) demonstraram que o grupo de complementação D é heterogêneo, consistindo de dois genes distintos, *FANCD1* e *FANCD2*.

Devido à raridade da doença, a tentativa de clonagem dos oito genes foi muito difícil e somente através de complementação e tecnologia de clonagem posicional, todos os genes foram clonados (*FANCA*, *FANCC*, *FANCD1*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF* e *FANCG*), exceto o *FANCB* (HUSSAIN et al., 2003; WEST, 2003)

Em 2002, HOWLETT et al. demonstraram que o gene *FANCD1* era na realidade o gene *BRCA2*. A primeira conexão entre a patogenia da AF e a predisposição herdada ao câncer de mama veio de estudos de células com mutações no gene *BRCA2*. Células com mutações no gene *BRCA2* adquirem aberrações cromossômicas semelhantes ao fenótipo da AF, e são também hipersensíveis aos agentes promotores de ligação cruzada (PATER et al., 1998). De 10 a 30% dos pacientes com câncer de mama familiar herdam alterações na linhagem germinativa, inativando um alelo do *BRCA2*, e o segundo alelo é inativado por mutação somática nas células tumorais destes pacientes (NATHANSON et al., 2001).

A confirmação de que o gene *FANCD1* corresponde ao *BRCA2* veio da análise de complementação de linhagem celular de *FANCD1* com DNAC codificando uma proteína completa do *BRCA2*. Evidências preliminares sugeriram que linhagens celulares do *FANCB* também carregam dois alelos anormais do *BRCA2*, sendo provavelmente correspondente ao *FANCD1* (HOWLETT et al., 2002).

MEETEI et al. (2003) relataram um novo componente no complexo protéico da AF, chamado PHF9 ou FANCL que possui atividade E3 ubiquitina ligase *in vitro* e

é essencial para monoubiquitinação da proteína FANCD2 *in vivo*. Devido ao gene *PHF9* ou *FANCL* estar mutado em uma linhagem celular de um indivíduo com AF, os autores concluíram que o *FANCL* representa um novo grupo de complementação na Anemia de Fanconi. Seus dados sugerem que o produto do *FANCL* tem um papel crucial no desenvolvimento da AF como uma provável subunidade catalítica requerida para a monoubiquitinação da proteína FANCD2.

LEVITUS et al. (2003) relataram oito pacientes não relacionados que foram excluídos dos subtipos conhecidos. Quatro das linhagens celulares não complementaram outras células somáticas híbridas e por isso representariam um novo grupo determinado *FANCI*. As linhagens celulares restantes complementaram o grupo *FANCI*, mas não complementaram as outras, então representado um segundo grupo, *FANCI*. Tanto as linhagens *FANCI* e *FANCI* foram capazes de formar um complexo multiprotéico. Este complexo é requerido para a ativação da proteína FANCD2 por monoubiquitinação. Portanto, é provável que no mínimo dez genes estejam envolvidos na AF, não considerando o *FANCB* que na verdade pode ser o *FANCD1*.

A Figura 1 ilustra a cascata de eventos envolvendo estas proteínas após dano no DNA. As proteínas FANCA, FANCC, FANCE, FANCF e FANCG formam um complexo nuclear. Em resposta ao dano ao DNA, e durante a replicação, o complexo pode ser ativado resultando na monoubiquitinação da FANCD2. A FANCD1 (BRCA2) é requerida para a ubiquitinação da FANCD2. Por sua vez, a proteína FANCD2 ativada une-se à BRCA1 no núcleo, onde pode interagir com outras proteínas de reparo.

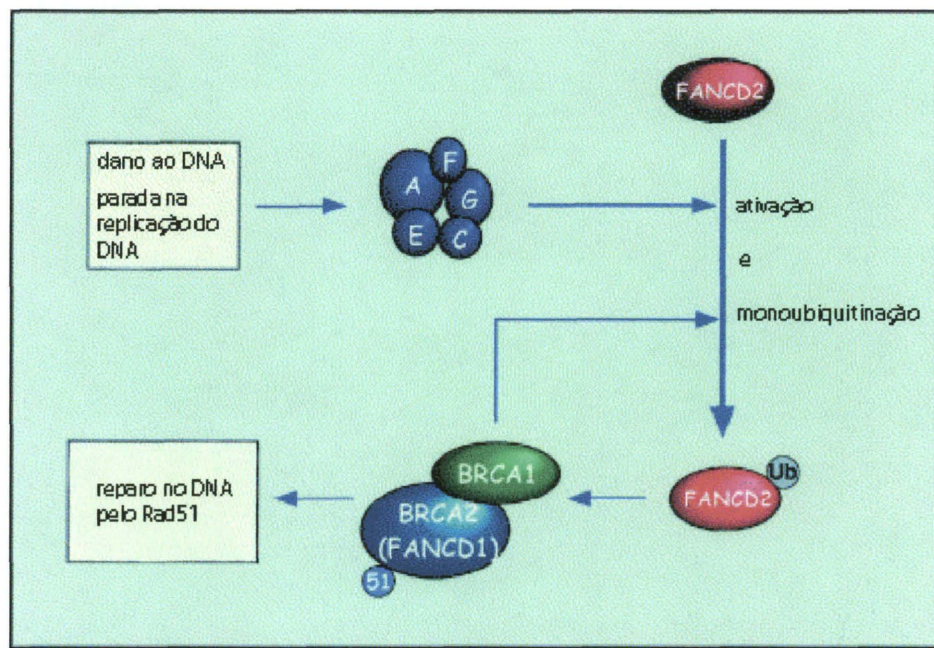


Figura 1. Proteínas FANCD envolvidas no reparo do DNA (WEST, 2003)

I.3.1.1. Nomenclatura

Antes de 1998 os grupos de complementação AF eram designados através das letras FACA ("Fanconi Anemia Complementation Group A"), FACB, FACC e assim por diante, ou somente FAA, FAB, FAC, FAD, FAE, FAF, FAG (conforme JOENJE e PATEL, 2001) ou ainda separadas com um hífen: FA-A, FA-B, FA-C, FA-D, FA-E, FA-F, FA-G. Outras publicações usavam a nomenclatura diferente para o gene e para a proteína. E poucas usavam FA1, FA2, etc., ou FA(A), FA(B), etc., ou ainda letras minúsculas: fa ou fa1 ou faa ou faca (conforme MAGDALENA, 1999).

A partir de 1998 houve uma padronização na nomenclatura dos genes da AF em resposta aos esforços do Comitê de Nomenclatura do Projeto Genoma Humano (www.ornl.gov/hgmis/research/research.html).

Em Junho de 2003, o Comitê de Nomenclatura do Projeto Genoma Humano aprovou a simbologia genuína para a AF como FANC mais a última letra para referir-se a cada um dos grupos de complementação. De acordo com este Comitê, um paciente, por exemplo, do grupo de complementação A pode ainda ser referido como um paciente FA-A ou *FANCA* e a doença Anemia de Fanconi, é abreviada como FA (www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/guidelines.html).

Atualmente o Comitê de Nomenclatura do Projeto Genoma Humano considera 8 genes confirmados por mutações em pacientes (*FANC* – A, C, D1, D2, E, G, L) e mais três em estudo (*FANCB*, *FANCI* e *FANCJ*) (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização dos genes da Anemia de Fanconi

	Localização cromossômica	Éxons	Aminoácidos	Peso molecular (kDa)
<i>FANCA</i>	16q24.3	43	1455	163
(<i>FANCB</i>)*				
<i>FANCC</i>	9q22.3	14	557	63
(<i>FANCD1</i>)*				
<i>FANCD2</i>	3p25.3	44	1451	155/162
<i>FANCE</i>	6p21-22	10	536	
<i>FANCF</i>	11p15	1	374	42
<i>FANCG</i>	9p13	14	622	68
<i>FANCI</i>				
<i>FANCJ</i>				
<i>FANCL</i>	2p16.1			
<i>FANCB</i> e <i>FANCD1</i> podem ser o mesmo gene – <i>BRCA2</i>				

Fonte: TISCHKOWITZ e HODGSON, 2003 (modificado).

I.3.1.2. Frequência dos Grupos de Complementação

Com base nos estudos de complementação de 47 pacientes com AF originários da Europa, EUA e Canadá, BUCHWALD (1995) estimou as seguintes

freqüências dos vários subtipos: 31 do grupo A (66%), dois do grupo B (4,3%), seis do grupo C (12,7%), dois do grupo D (4,3%) e seis do grupo E (12,7%).

JAKOBS et al. (1997) determinaram a distribuição dos diferentes grupos de complementação estudando 113 famílias com AF, originárias da América do Norte, representadas pelo FACRP (*Fanconi Anemia Cell Repository*), observando que: 69% dos pacientes eram do grupo A, 18% do grupo C, 4% do grupo D e 9% do grupo B ou E. Freqüência semelhante (64%) para o FANCA foi descrito por MAGDALENA (1999) analisando 28 pacientes da população brasileira.

FAIVRE et al. (2000) estudaram um total de 245 pacientes AF provenientes de 179 famílias, registradas durante o período de 1989-1999 pelo EFARG (*European Fanconi Anemia Research Group*) e originários de 24 países, incluindo África do Sul (49), Reino Unido (33), Alemanha (29), Turquia (27), Itália (20), França (18), Holanda (18), Emirados Árabes (sete), Egito (seis), Estados Unidos da América (seis), Índia (quatro), Paquistão (quatro), Espanha (quatro), Bangladesh (três), China (três), Arábia Saudita (dois), Grécia (dois), Líbano (dois), Polônia (dois), Rússia (dois), África (um), Áustria (um), Brasil (um) e Hungria (um) e obtiveram a seguinte classificação: 172 pacientes do grupo A (70.2%); um do grupo B (0.4%); 34 do grupo C (13.9%); três do grupo D (1,2%); cinco do grupo E (2%); seis do grupo F (2.5%) e 24 do grupo G (9.8%).

A porcentagem de pacientes por grupo de complementação referido pelo EUFAR (*European Fanconi Anaemia Registry*) é estimada como sendo: 65 a 70% do grupo A, menor do que 2% do grupo B, entre 10 e 15% do grupo C, menor do que 2% do grupo D, entre 2 e 5% do grupo E, menor do que 2% do grupo F e 10% do grupo G (DOKAL, 2000).

I.4. DIAGNÓSTICO

I.4.1. Citogenético

Devido à grande variabilidade fenotípica, tanto em relação à presença como à gravidade dos sinais e sintomas, o diagnóstico puramente clínico é extremamente difícil. Segundo D'ANDREA e GROMPE (1997), aproximadamente 33% dos pacientes com AF não possuem anormalidades congênitas e conforme ALTER (1991) muitos pacientes com AF, mesmo que apresentem malformações anatômicas, não são diagnosticados até que as manifestações hematológicas se desenvolvam. Considerando que as células AF têm uma frequência aumentada de quebras cromossômicas espontâneas (figura 2a) comparada com células normais, e que esta frequência pode ser amplificada pela adição ao meio de cultura de agentes clastogênicos ou alquilantes que induzem, inclusive, a formação de figuras radiais (figura 2b), tais observações são utilizadas para a confirmação do diagnóstico da doença (SCHULER et al., 1969; SASAKI, 1975; AUERBACH e WOLMAN, 1976; AUERBACH e WOLMAN, 1978; POLL et al., 1984; TIMME e MOSES, 1988).

Os agentes alquilantes mais utilizados são a mitomicina C, a cisplatina e o diepoxibutano (DEB). De acordo com o IFAR (*International Fanconi Anemia Registry*), homozigotos para AF têm uma média de 8,96 (variação de 1,3 a 23,9) quebras por célula em linfócitos de sangue periférico cultivados com DEB, comparada a uma média de 0,06 (variação de 0 a 0,36) nas mesmas células de indivíduos normais (AUERBACH et al., 1989).

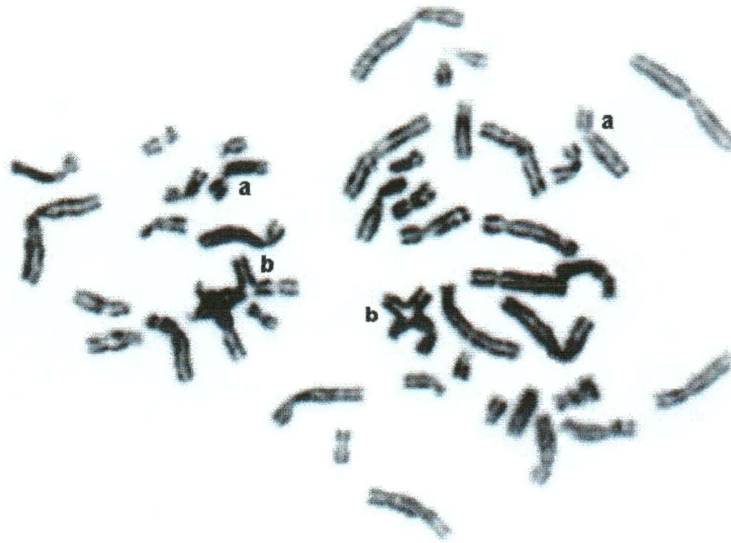


Figura 2 – Metáfase de um paciente com AF demonstrando quebras (a) e figuras radiais (b).

O estudo das quebras cromossômicas pode ser conduzido sobre células amnióticas, células da vilosidade coriônica ou sangue fetal, podendo portanto, ser utilizado para diagnóstico pré-natal. Linfócitos e fibroblastos também podem ser utilizados para diagnóstico de crianças e adulto. Apesar do teste citogenético com DEB ser altamente específico e sensível, ele não é capaz de distinguir entre os diferentes grupos de complementação e de identificar os heterozigotos (AUERBACH et al., 1981).

I.4.2 Clínico

Através do estudo de 328 pacientes registrados no IFAR, AUERBACH et al. (1989), além de demonstrarem estatisticamente que a sensibilidade aumentada ao efeito clastogênico do DEB é um fator discriminativo para a AF, desenvolveram um sistema de escore para o diagnóstico clínico, baseado em oito sinais. Os seis sinais que obtiveram coeficiente positivo foram: microcefalia, anormalidades renais e urinárias, trombocitopenia, retardo do crescimento, marcas de nascimento (manchas hiperpigmentadas), anomalias do rádio e anomalias do polegar. Entre os dois sinais que obtiveram coeficiente negativo estão a dificuldade do aprendizado e outras anormalidades esqueléticas. O diagnóstico é feito somando um ponto para cada um dos seis sinais positivos e subtraindo um ponto para cada um dos sinais variáveis negativos. Os pacientes com escore, por exemplo, +2 têm 75% de probabilidade de serem portadores da AF.

I.4.3. Molecular

A clonagem dos genes AF está tendo um grande impacto no diagnóstico e no tratamento dos pacientes portadores de AF. A análise direta dos genes AF, permite um diagnóstico mais rápido, preciso e será possivelmente a base para o diagnóstico pré-natal em famílias de afetados (D'ANDREA e GROMPE, 1997).

O teste baseia-se na amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a mutação gênica responsável pela doença. O estudo molecular é de grande importância para a identificação de heterozigotos e de pacientes com mosaïcismo somático onde o teste com DEB pode resultar falso

negativo (DOKAL, 2000). O mosaïcismo somático ocorre por reversão do alelo mutante para o tipo selvagem em uma única célula hematopoética.

I.5. TRATAMENTO

Até meados da década de 90, o tratamento do paciente com AF consistia de medidas paliativas e de suporte, as quais prolongavam e melhoravam suas condições de vida. Essas medidas incluíam a reposição dos derivados do sangue, administração de andrógenos ou corticosteróides para estimular a medula óssea, antibióticos de amplo espectro e a prevenção à exposição a agentes que pudessem precipitar o sangramento ou infecção.

Mais recentemente, foi verificado que as manifestações hematológicas, que são as principais determinantes da sobrevida do paciente, podem ser corrigidas pelo transplante de medula óssea (TMO). No entanto, apesar do TMO eliminar as manifestações hematológicas da doença, independente do grupo de complementação, os pacientes são susceptíveis a complicações associadas ao uso de ciclofosfamida (ZANIS-NETO et al., 1995), além de uma grande parte dos mesmos não possuírem doadores histocompatíveis.

Uma alternativa, seria a transdução retroviral de um gene AF em células tronco hematopoéticas, opção bastante viável e que vem sendo estudada por vários centros de pesquisas (KUPFER et al., 1997).

Apesar de úteis, os estudos de transferência gênica assim como o TMO, não corrigem as anormalidades do desenvolvimento ou o risco de câncer em tecidos não hematopoéticos. Assim, a clonagem e o melhor conhecimento dos genes e proteínas

AF, poderão trazer maiores esclarecimentos em outros aspectos clínicos da AF, como por exemplo a susceptibilidade ao câncer.

O tratamento da leucemia, nestes pacientes, é ineficiente. Geralmente, os mesmos morrem dentro de um a dois meses após diagnosticados. Muitos deles têm pré-existência de mielodisplasia sendo freqüente o encontro de anormalidades citogenéticas nos cromossomos 1 e 7, entre elas, monossomias, deleções ou translocações (STIVRINS et al.,1984; MAAREK et al.,1996). THURSTON et al. (1999), tornaram a análise por FISH com o uso de sondas centroméricas do cromossomo 7, uma prática rotineira. A detecção da monossomia deste cromossomo nas células da medula óssea (MO), poderia resultar numa intervenção terapêutica precoce como o TMO, para prevenir ou protelar o começo da leucemia nestes pacientes.

I.6. ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM AF

Pacientes com AF apresentam um risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias de vários sistemas orgânicos incluindo a pele, sistemas gastrointestinal e ginecológico e, principalmente leucemias mielóides agudas (LMA), presente em cerca de 15 a 20% dos pacientes que entram na segunda década de vida (D'ANDREA e GROMPE, 1997). Estes pacientes usualmente são portadores de clones cariotipicamente anormais na medula óssea, sendo que estes clones podem preceder o aparecimento da doença maligna, estando relacionados ao risco de desenvolvimento da mesma (AUERBACH, 1992). As alterações genéticas mais comumente envolvidas nos diferentes estágios da AF são as monossomias e os

rearranjos dos cromossomos 7 e 1, porém a maioria dos cromossomos já foram descritos em diferentes cariótipos. Na revisão que se segue, nos deteremos mais no envolvimento do cromossomo 1, alvo principal deste estudo.

Os primeiros estudos feitos em células da medula óssea de pacientes com AF datam da década de 60. SCHROEDER et al. (1964) analisaram 35 metáfases em dois pacientes e não encontraram aberrações cromossômicas. BLOOM et al. (1966) observaram um cariótipo normal em 32 metáfases de um paciente. DOSIK et al. (1970) descreveram uma família onde havia dois pacientes afetados, um dos quais desenvolveu leucemia mielomonocítica aguda. As células da medula óssea tanto do paciente como da mãe apresentaram cariótipo normal.

BERGER et al. (1977), em um paciente pré-leucêmico, identificaram o cariótipo 46,XX,dup(3)(q12q27),add(12)(q24), e na fase leucêmica (LMA) houve uma maior complexidade cariotípica com o aparecimento de clones com material adicional nos cromossomos 1 e 7: 46,XX,add(1)(p36),dup(3)(q12q27),add(7)(p22),add(12)(q24).

CARBONE et al. (1984) descreveram uma paciente com anemia aplástica, de 31 anos de idade, sem evidências de anormalidades congênitas. Em duas análises citogenéticas da medula óssea, observaram clones anormais. Na primeira, detectaram dois clones, com cariótipos 48,XX,+9,+16 e 46,XX,dup(1)(q24q32),t(17;?)(p12-13;?). Em análise subsequente, encontraram somente o clone 46,XX,t(17;?)(p12-13;?).

BERGER et al. (1993) descreveram análises de células de medula óssea de cinco pacientes previamente diagnosticados como portadores de AF. Destes, três apresentavam LMA, observando-se, respectivamente, os seguintes cariótipos: 47,XY,trp(1)(q32q44),+mar; 45,XY,-7 e 46,XY,add(1)(p34),del(7)(p13).

FERTI et al. (1996) analisando a medula óssea de um paciente de 22 anos de idade, diagnosticado com LMA, encontrou o cariótipo 47,XY,der(6)t(1;6)(q23;p22),+mar em todas as metáfases. O cromossomo marcador provavelmente originava-se de 1q.

MAAREK et al. (1996) detectaram anormalidades clonais nas células da medula óssea de 20 pacientes AF, dos quais 12 não apresentavam anormalidades morfológicas nas células hematopoéticas. Destes 12 pacientes, quatro apresentaram aberrações envolvendo o cromossomo 7, dois com monossomia, um com isocromossomo 7q e um com translocação t(7;18)(q31;p11), que evoluiu para LMA. Três pacientes apresentaram rearranjos estruturais envolvendo o cromossomo 1 e cinco pacientes apresentaram aberrações clonais envolvendo os cromossomos 13, 17, 18, 21 e 22.

THURSTON et al. (1999) descreveram uma paciente AF com dez anos de idade, que ao diagnóstico, em dezembro de 1991, apresentou cariótipo normal (46,XX) em células da medula óssea. Após dois anos e meio, em maio de 1994, a análise citogenética demonstrou em uma de 20 células a monossomia do cromossomo 7. Esta mesma amostra quando analisada por FISH, apresentou a mesma aberração em oito (4%) de 199 células. O mesmo cariótipo foi observado em janeiro de 1995, porém a análise por FISH detectou a monossomia do 7 em 43 (21,5%) de 200 células analisadas. Onze meses após, observou-se esta aberração em duas de 30 células e a análise por FISH detectou a monossomia do 7 em 83 (40%) de 207 células analisadas. Em abril de 1996, a análise citogenética demonstrou cariótipo 47,XX,-7,+21,+22[7]/46,XX[12]. A paciente foi submetida ao transplante de medula óssea sendo previamente analisadas 20 células que apresentaram o cariótipo 45,XX,-7,add(18)(p11.2). Vinte e seis dias após o

transplante a paciente foi a óbito devido a uma infecção necrotizante causada por fungos em seus pulmões. Este caso levou os autores a sugerirem a análise por FISH para detectar clones anormais antes que pudessem ser detectados pela citogenética clássica, motivando-os a pesquisar a monossomia do 7 por FISH como uma rotina em seus pacientes. Neste mesmo estudo, THURSTON et al. (1999) analisaram através da citogenética clássica, 13 amostras da medula óssea de nove pacientes AF que não exibiam monossomia do 7 e seis amostras de cinco pacientes com monossomia do 7. Entre os nove pacientes AF, um apresentou cariótipo 46,XX,dup(1)(p22p34),add(18)(p11.3) e os demais cariótipo normal. Nenhum dos pacientes AF demonstrou a monossomia do 7 pela análise por FISH e não tiveram evolução para leucemia.

ALTER et al. (2000) descreveram os resultados de 41 pacientes com AF, analisados durante o período de 1980 a 1998, dos quais 16 (39,02%) tinham anormalidades clonais. Destes, 12 (75%) foram analisados citogeneticamente quando não apresentavam anormalidades morfológicas nas células hematopoéticas, sendo que cinco apresentaram aberrações estruturais envolvendo os cromossomos 3, 13, 14, 16 e 21. Dois, com monossomia do 7 e com t(5;22)(q?;q?), evoluíram posteriormente para LMA, além de outros cinco com aberrações numéricas e/ou estruturais dos cromossomos X, 1, 2, 3, 6, 7, 8, 11 e 21. Estes últimos pacientes foram reanalisados citogeneticamente quando evoluíram para MDS, sendo que quatro apresentaram o mesmo cariótipo identificado na fase anterior (AF) e, em um, houve a perda da del(7)(p15). Quatro (25%) dos 16 pacientes foram estudados somente na fase com MDS observando-se aberrações numéricas e/ou estruturais dos cromossomos 1, 2, 6, 7, 11, 12, 13 e 17, sendo mais freqüentes as dos cromossomos 1 e 7. Um destes pacientes, com cariótipo

46,XY,der(18)t(1;18)(q12;p11)[19]/46,XY,idem,del(12)(p12.1)[2], desenvolveu LMA, quando o clone com a deleção do 12 não foi observado.

FERRO et al. (2001) descreveram um paciente com AF e MDS. A análise das células da medula óssea, na fase de MDS, apresentaram triplicação do braço longo do cromossomo 1, cujo cariótipo foi 46,XY,trip(1)(q12-21q31-q32),add(11)(p15),add(21)(q22).

OLIVEIRA et al. (2002) descreveram um caso de um paciente cuja análise citogenética revelou dois cariótipos distintos, ambos envolvendo o cromossomo 1 - 46,XY,dup(1)(q21q42) e 46,XY,del(1)(q32) - em dois estágios diferentes da doença.

A Tabela 3 resume os resultados dos estudos citogenéticos em 64 pacientes AF descritos na literatura, registrados de acordo com o quadro clínico do paciente no momento da análise: primeiramente os analisados na fase de AF sem alterações hematológicas, seguidos por aqueles com MDS e LMA (cf. OLIVEIRA, 2001).

Continuação

Standen et al., 1989	1	8	1	47,XY,+8[?]	MDS	MDS
Thompson et al., 1991	1	8 Y, 1 e 8	1	47,XY,+8[?] 47,XY,+8[40]/46,X,-Y,+der(Y)(Y:1)(q12,q21)[3] 47,XY,+8[100]	MDS * **	MDS
Maarek et al., 1996	8	9 10 4 7 7 12 e 18 2, 6, 12 e 17 Y 6, 7 e 21 20 7	1	47,XX,+mar[8]/48,XX,del(9)(q11),+(9)(q10),+mar[2]/46,XX[8] 47,XX,+mar[1]/47,XX,add(10)(p15),+mar[7] 47,XX,add(4)(q35),+mar[27]/47,XX,+mar[2]/46,XX[1] 46,XY,i(7)(q10)[3]/46,XY[18] 46,XY,del(7)(7:?) (q31:?) [14] 46,XX,der(18)t(12;18)(q21;q22)[10] 45,XY,add(2)(q37),add(6)(p25),del(12)(p11),-17[9] 45,X,-Y,add(2)(q37),add(6)(p25),del(12)(p11)[10] 45,XX,add(6)(q27),-7,-21,+mar1,+mar2[22]/46,XX[2] 46,XX,add(6)(q27),-7,del(7)(p15),-20,-21,+mar1,+mar2,+[12]/46,XX[2] 45,XX,-7[19] 46,XY,dup(1)(q21q31),add(5)(q35),del(6)(p22)[cp22]	MDS * ** MDS MDS MDS MDS * MDS * MDS MDS MDS LMA-M2 LMA	MDS
Babu Rao et al., 2001	1	1 e 11	1	46,XY,dup(1)(q21q32),add(11)(q23)[?]	MDS	LMA
Ferro et al., 2001	1	1, 11 e 21	1	46,XY,trip(1)(q12.21q31-q32),add(11)(p15),add(21)(q22)[21]	MDS	
Berger et al., 1977	1	3 e 12 1, 7	1	46,XX,dup(3)(q12q27),add(12)(q24)[?] 46,XX,add(1)(p36),dup(3)(q12q27),add(7)(p22),add(12)(q24)[?]	Pré-leucemia LMA	LMA
Meissner et al., 1978	1	C	1	45,XX,-C[18]	eritroleucemia	
Berger et al., 1980	2	2 21	1	46,XX,dup(2)(q24q36)[39]/46,XX[24] 46,XX,-21,+mar[24]/46,XX[1]	Pré-leucemia Pré-leucemia	
Huret et al., 1988	1	1, 2, 5 e 6	1	46,XY,-6,der(6)t(1;6)(q12;p25)[37]/46,xy,idem,del(5)(q21q23)[9] 46,XY,-6,der(6),t(1;6)(q12;p25)[40]/-2,+der(2),t(1;2)(q12;q37,del(5)(q21q23)[5]	MDS *	
Bourgeois e Hill, 1977	1	5 e 18	1	46,XY,t(5;18)[150]	LMA	LMA
Berger et al., 1980	1	1, 3 e 7	1	46,XY,dup(1)(p32-p34),tp(3q)(q12-q27),del(7)(p11-pter)[63]	LMA-M6 LMA	LMA
Auerbach et al., 1982	1	7 e 8	1	46,XX,-7,-8,+mar1,+mar2[11] 46,XX,-7,+mar[1]/46,XX[1]	LMA *	LMA
Stivins et al., 1984	2	7 7	1	45,XX,-7[8]/46,XX[10] 45,XX,-7[22]/46,XX[1]	LMA LMA	LMA LMA
Bessho et al., 1989	1	1	1	45,XX,der(1)t(1;?) (p36:?) [?]	LMA-M4	LMA
Berger et al., 1993	3	1 7 1 e 7	1	47,XY,trip(1)(q32q44),+mar[13]/46,XY[1] 45,XY,-7[13]/46,XY[1] 46,XY,add(1)(p34),del(7)(p13)[14]	LMA LMA LMA	LMA LMA LMA
Ferri et al., 1996	1	1 e 6	1	47,XY,der(6)t(1;6)(q23;p22),+mar[?]	LMA	LMA
Sugita et al., 2000	1	11 e 16	1	46,XY,t(11;16)(q23;p13)[20]	LMA-t	LMA

N.T.PAC. = Número total de pacientes; N.PAC. = Número de pacientes; EVOL. CLIN. = Evolução clínica; AF = Anemia de Fanconi; MDS = Síndrome Mielodisplásica; LMA = Leucemia Mielóide Aguda; * = 2ª análise; ** = 3ª análise.
(Fonte: OLIVEIRA, 2001)

II . JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O Serviço de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital de Clínicas (HC) da UFPR, é considerado um centro de referência no diagnóstico e tratamento de pacientes com AF. Na Unidade de Citogenética do HC, UFPR, são realizados os testes com DEB para a confirmação diagnóstica dos pacientes e familiares e a análise citogenética em células da medula óssea para o acompanhamento dos afetados. No período de maio de 2002 a fevereiro 2004 foram estudadas citogeneticamente nesta Unidade, as células da medula óssea de 36 pacientes portadores de AF, com confirmação diagnóstica através do estudo cromossômico pelo emprego do DEB. Considerando que aberrações no cromossomo 1 estão entre as mais freqüentes observadas em pacientes com AF, foi de interesse avaliar a sua ocorrência na amostra acima descrita e realizar uma análise citogenética detalhada das referidas aberrações observadas na mesma. Sendo assim, os objetivos específicos deste plano de trabalho foram:

- 1- Determinar a freqüência de pacientes com aberrações clonais no cromossomo 1 entre aqueles com aberrações cromossômicas;
- 2- Determinar a freqüência de aberrações clonais no cromossomo 1 do total de aberrações observadas nos pacientes;
- 3- Analisar a casualidade de ocorrência das aberrações cromossômicas clonais nos cromossomos que as apresentaram, estabelecendo a efetiva participação quantitativa do cromossomo 1;
- 4- Identificar os pontos de quebra detectados correlacionando-os com a presença de genes envolvidos em processos neoplásicos;
- 5- Comparar as informações obtidas com as disponíveis na literatura.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. AMOSTRA

A amostra total foi constituída por 36 pacientes, 13 do sexo masculino e 23 do sexo feminino, com idades entre um e 29 anos ($\bar{x} = 11,53 \pm 6,59$), com diagnóstico de AF, previamente confirmado pelo teste com DEB. Treze pacientes apresentaram aberrações cromossômicas clonais. Destes, 5 pacientes, 2 do sexo masculino e 3 do sexo feminino, com idades entre 10 e 29 anos ($\bar{x} = 15,80 \pm 7,60$), apresentaram aberrações clonais no cromossomo 1 e constituíram a amostra específica do presente estudo, de acordo com os objetivos propostos.

III.2. COLETA, CULTURA, PREPARAÇÃO CITOLÓGICA E ANÁLISE CITOGENÉTICA EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA

III.2.1. Coleta das Amostras

A coleta do material foi realizada no Ambulatório de Hematologia ou da Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital Clínicas de (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Cerca de 5 ml de medula óssea foram aspirados a partir da crista ilíaca posterior. O material foi enviado para a Unidade de Citogenética, Laboratório de Imunogenética, HC, UFPR, onde foi realizada a preparação citológica.

III.2.2. Cultura e Preparação Citológica

Para a obtenção dos cromossomos metafásicos em amostras da medula óssea, foi utilizado o método descrito por WILLIAMS et al. (1984), com modificações, conforme descrito a seguir.

Após a coleta, a seringa foi enviada à Unidade de Citogenética, onde o material foi colocado em dois frascos de cultura (RPMI 1640 - Gibco) suplementado com 30% de soro bovino fetal. O material foi incubado por 24 horas a 37°C. Após este período, foi adicionado 0,1 ml de colchicina Sigma (concentração final de 0,016µg/ml).

1. Após 55 minutos de exposição à colchicina, o material foi centrifugado a 1000 rpm por 8 minutos;
2. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1ml de cloreto de potássio (KCl) 0,075M a 37°C. Ressuspendeu-se lentamente e adicionou-se mais 9 ml de KCl. Após cuidadosa ressuspensão, o material foi deixado em repouso por mais 30 minutos;
3. Centrifugou-se a 1000 rpm por 8 minutos e retirou-se o sobrenadante;
4. Acrescentou-se 1 ml do fixador (3 volumes de metanol para 1 de ácido acético glacial) recém preparado. Completou-se o volume para 10 ml;
5. O material foi deixado de 15 a 20 minutos em temperatura ambiente;
6. Centrifugou-se a 1000 rpm por 10 minutos;
7. Repetiu-se a etapa número 3 pelo menos duas vezes ou até obter um botão de células límpido;

8. Ao sedimento final acrescentou-se 1 ml de fixador e estocou-se em freezer -20° C até o momento da análise.

III.2.3. Bandeamento Cromossômico GTG

Foi utilizada a técnica de SCHERES (1972), com modificações.

1. Duas gotas da suspensão foram distribuídas em lâminas, previamente lavadas e mantidas na geladeira em álcool absoluto;
2. Após a secagem, que ocorreu naturalmente, as lâminas foram estocadas para obtenção das bandas G.
3. As lâminas foram imersas em solução de tripsina 0.04% diluída em tampão fosfato, pH 6,8 por 6 a 12 segundos, conforme o tempo decorrido desde a preparação citológica;
4. A ação da tripsina foi interrompida mergulhando a lâmina rapidamente em solução fisiológica (cloreto de sódio – 0,9%);
5. As lâminas foram coradas com Giemsa diluído em tampão fosfato, pH 6,8, na proporção de 1:30, durante 5 minutos, lavadas em água destilada e depois de secas foram analisadas.

III.2.4. Análise Cromossômica e Obtenção dos Negativos

Após o bandeamento G, as metáfases foram desenhadas, analisadas e interpretadas, conforme o ISCN (1995). Foram considerados como contendo aberrações todos os cariótipos analisados e que continham a presença de pelo menos um clone anormal (mínimo de 3 células com a mesma monossomia e mínimo

de 2 células com a mesma trissomia ou alteração estrutural). Um mínimo de sete metáfases foram analisadas para confirmação do envolvimento clonal e exclusão de aberrações secundárias. Todas as amostras foram reanalisadas para confirmação do envolvimento clonal do cromossomo 1. Após essa segunda análise, no mínimo duas metáfases de cada clone foram selecionadas e fotografadas em microscópio comum, equipado com câmara fotográfica automática, contendo o filme AGFA COPEX PAN A.H.U. 35mm, 12 ASA. Objetiva 100. O filme foi revelado com o revelador D-72 e fixador Kodak. As cópias foram feitas em papel Kodabrome Print RCF3 Kodak, com revelador Dektol Kodak e fixador Kodak, depois de secas foram recortadas e cariotipada.

III.2.5. Análise Estatística

A casualidade de ocorrência das aberrações cromossômicas clonais no cromossomo que as apresentaram foi avaliada pelo teste χ^2 , conforme BEIGUELMAN, (1988).

IV. RESULTADOS

A Tabela 4 apresenta o número de aberrações clonais por cromossomo nos 13 pacientes que as apresentaram. Observa-se que a maior frequência (35,7%) de aberrações foi detectada no cromossomo 1. As informações sobre a análise citogenética deste cromossomo em cinco pacientes são apresentadas a seguir.

Tabela 4. Número de aberrações cromossômicas clonais observado em 13 pacientes com AF

Cromossomo Número	Número de Aberrações *		Total de Aberrações	Frequência %
	Estruturais	Numéricas		
1	106	0	106	35,7
2	0	3	3	1,0
3	14	0	14	4,7
5	66	0	66	22,2
6	2	0	2	0,67
7	0	3	3	1,0
11	4	3	7	2,36
12	2	3	5	1,7
13	10	8	18	6,1
15	3	6	9	3,0
18	0	14	14	4,7
19	0	6	6	2,0
20	3	14	17	5,7
21	0	8	8	2,7
22	0	11	11	3,7
X	0	8	8	2,7
Total	210	87	297	100

*= Foi considerado o número total de aberrações, iguais ou diferentes, identificadas nas células de cada paciente.

PACIENTE 1

Vinte e uma metáfases foram analisadas após o bandeamento GTG e todas apresentaram aberrações estruturais.

Cariótipo: 46,XX,dup(1)(q12q32)[2]/ 46,XX, idem,t(5;5)(q13q35)[19]

A figura 3 ilustra um cariograma contendo a dup(1)(q12q32).

A figura 4 ilustra cariogramas parciais com a dup(1)(q12q32).

A figura 5 ilustra cariogramas parciais com a t(5;5)(q13q35).

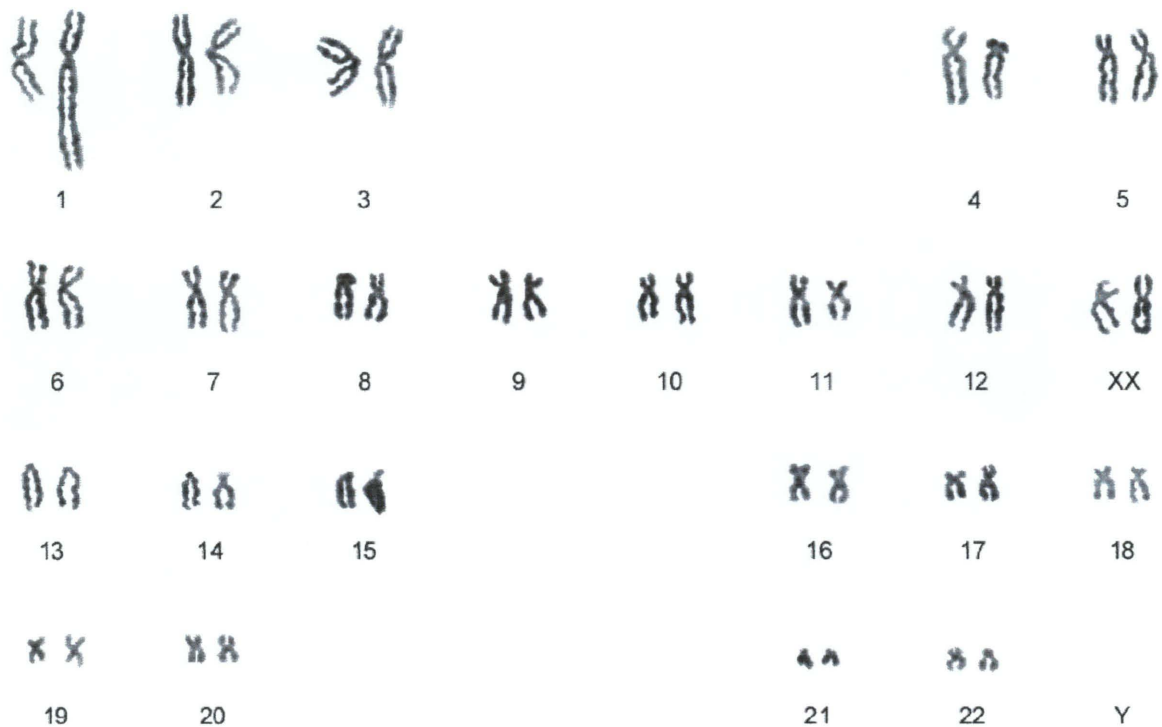


Figura 3 – Cariograma contendo a dup(1)(q12q32) observada no paciente 1.

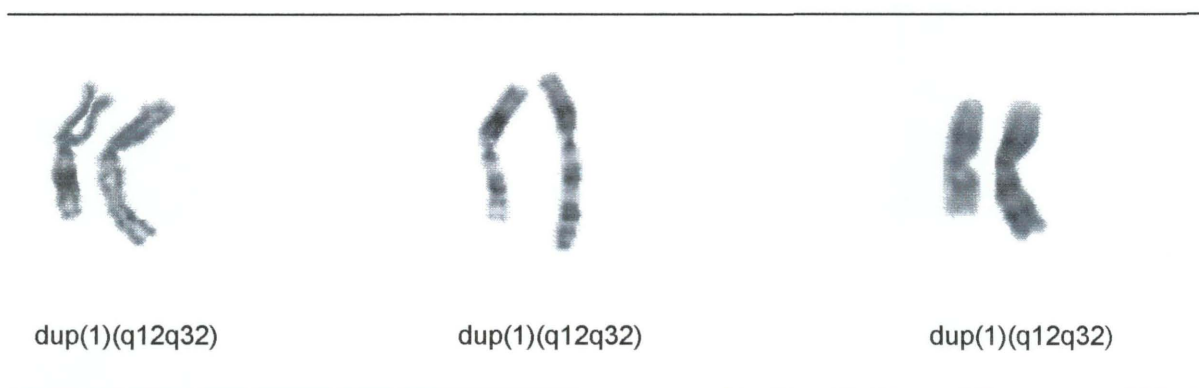


Figura 4 - Cariogramas parciais com a dup(1)(q12q32) observada no paciente 1.

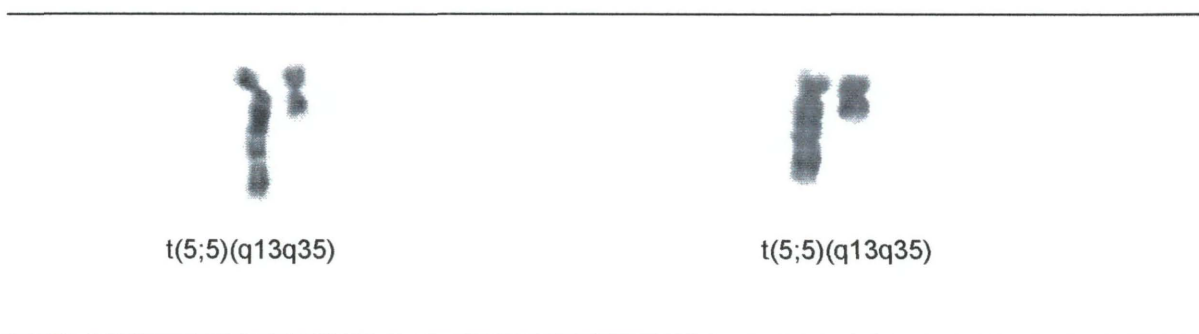


Figura 5 - Cariogramas parciais com a t(5;5)(q13q35) observada no paciente 1.

PACIENTE 2

Quarenta e duas metáfases foram analisadas após bandeamento GTG. Destas, nove (21,43%) apresentaram cariótipo normal e 33 (78,57%) apresentaram aberrações estruturais, formando dois clones relacionados e um não relacionado .

Cariótipo: 46,XX,dup(1)(q21q32)[25]/46,XX,idem,t(1;5)(p36q23)[3]/
46,XX,trp(1)(q21q32)[5]/46,XX,[9]

A figura 6 ilustra um cariograma contendo a dup(1)(q21q32).

A figura 7 ilustra cariogramas parciais contendo a dup(1)(q21q32).

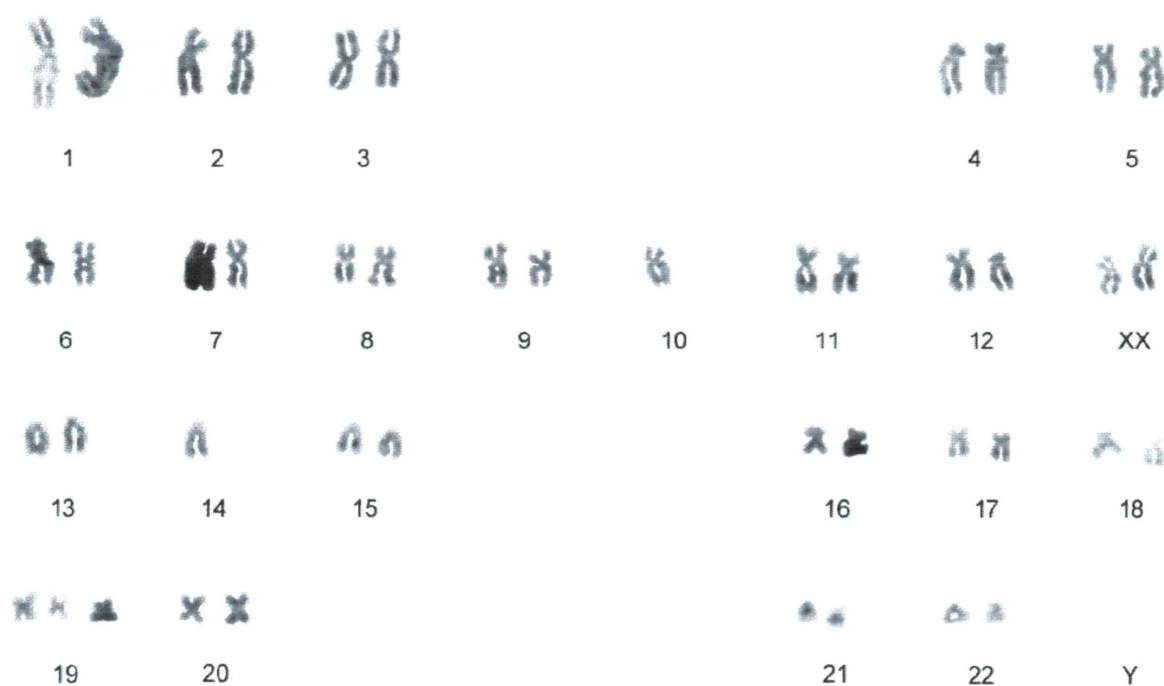


Figura 6 – Cariograma com a dup(1)(q21q32) observada no paciente 2.



Figura 7 – Cariogramas parciais com a dup(1)(q21q32) observada no paciente 2.

PACIENTE 3

Neste paciente foram feitas análises citogenéticas em dois diferentes períodos. No primeiro, realizado em 12/09/2001, foram analisadas após bandeamento GTG, 7 metáfases. Apesar do baixo número, todas as metáfases apresentaram aberrações estruturais. Na segunda análise, realizada em 12/11/2002, 21 metáfases foram analisadas, sendo que todas apresentavam aberrações estruturais.

Cariótipo em 12/09/2001: 46,XX,dup(1)(q23q43)[3]/46, XX,trp1(q21q43)[4]

Cariótipo em 12/11/2002: 39~46,X,del(X)(q11)[8],dup(1)(q21q43)[3], trp(1)(q21q43)[8],dup(5)(p13p15)[6],-11[3],-12[3],del(12)(p12)[2],del(13)(q12q22)[10], add(20)(q13)[3], -20[6][cp11]

As figuras 8 e 9 ilustram dois cariogramas contendo a trp(1)(q21q43) e as monossomias clonais dos cromossomos 11 e 20.

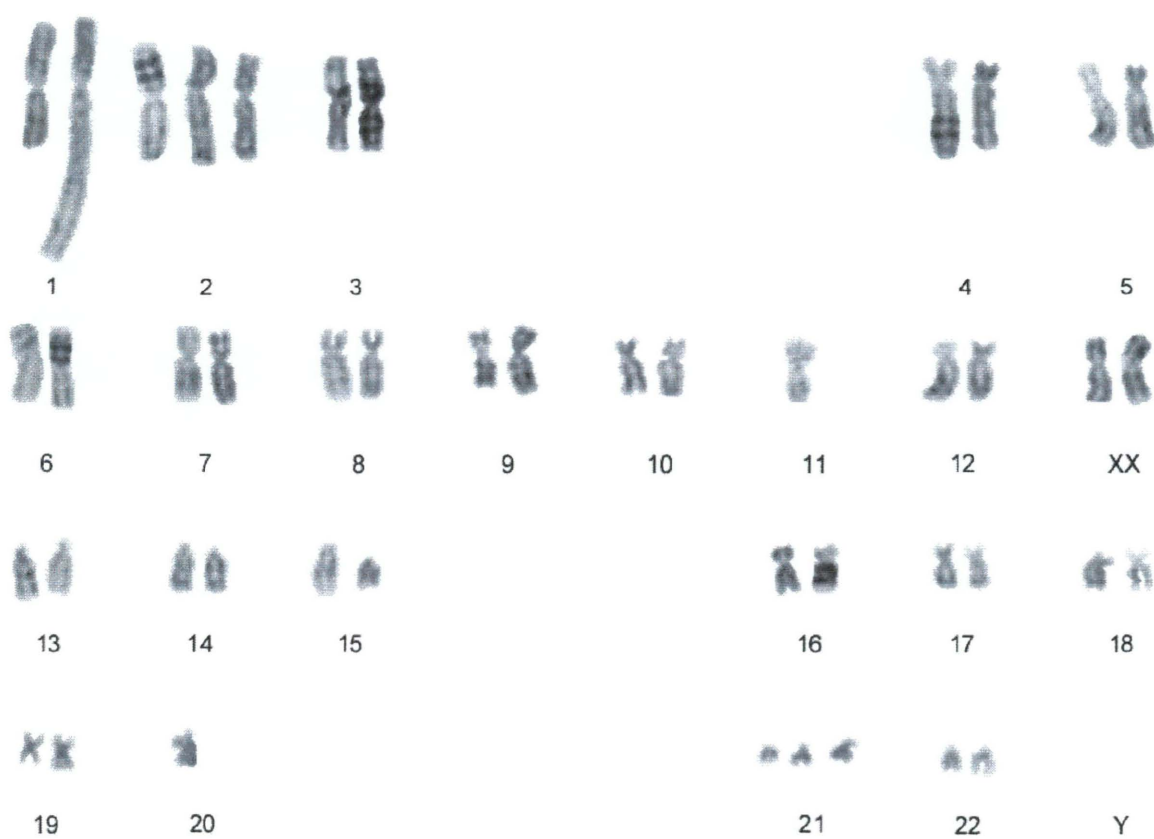


Figura 8 – Cariograma com a $trp(1)(q21q43)$ e monossomias clonais dos cromossomos 11 e 20 observadas no paciente 3.

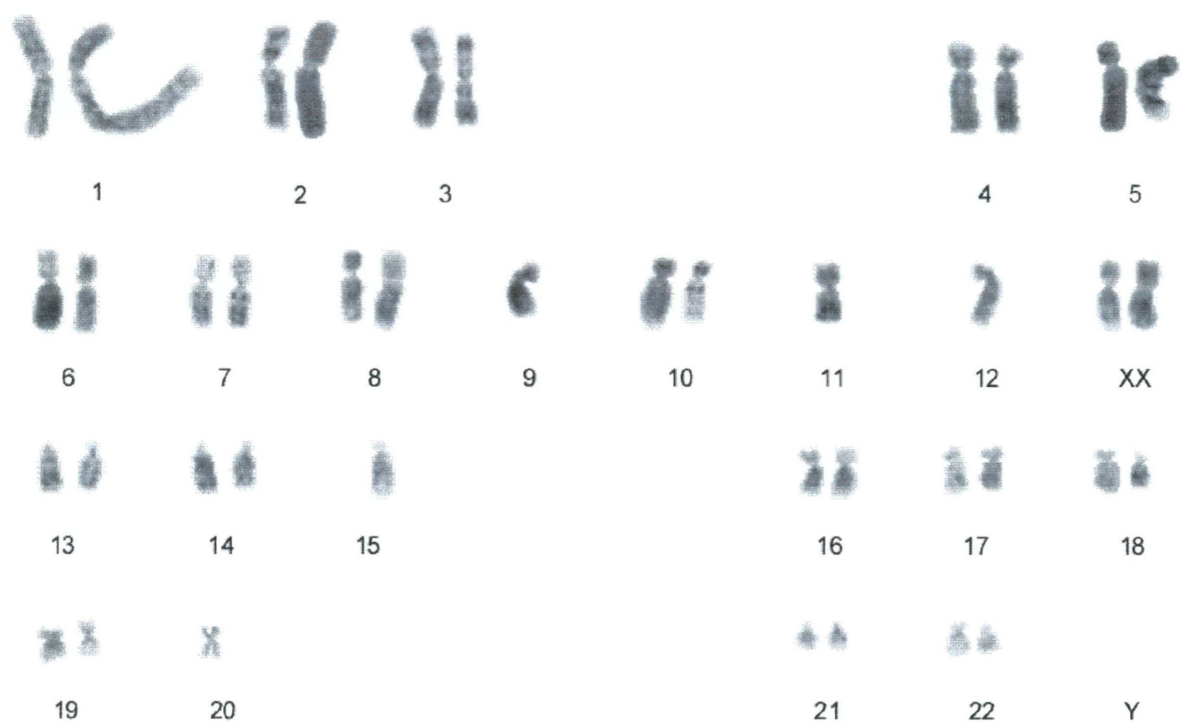


Figura 9 - Cariograma com a $trp(1)(q21q43)$ e monossomias clonais dos cromossomos 11 e 20 observadas no paciente 3.

PACIENTE 4

Foram analisadas neste paciente vinte metáfases após bandeamento GTG. Destas, 19 (95%) apresentaram aberrações estruturais e 1 (5%) apresentou cariótipo normal.

Cariótipo: 46,XY,dup(1)(p11p32),del(5)(q13q33)[15]/46,XY, idem,
del(11)(q23)[04]

A figura 10 ilustra um cariógrama contendo a dup(1)(p11p32) e a del(5)(q13q33).

A figura 11 ilustra cariógramas parciais contendo a dup(1)(p11p32).

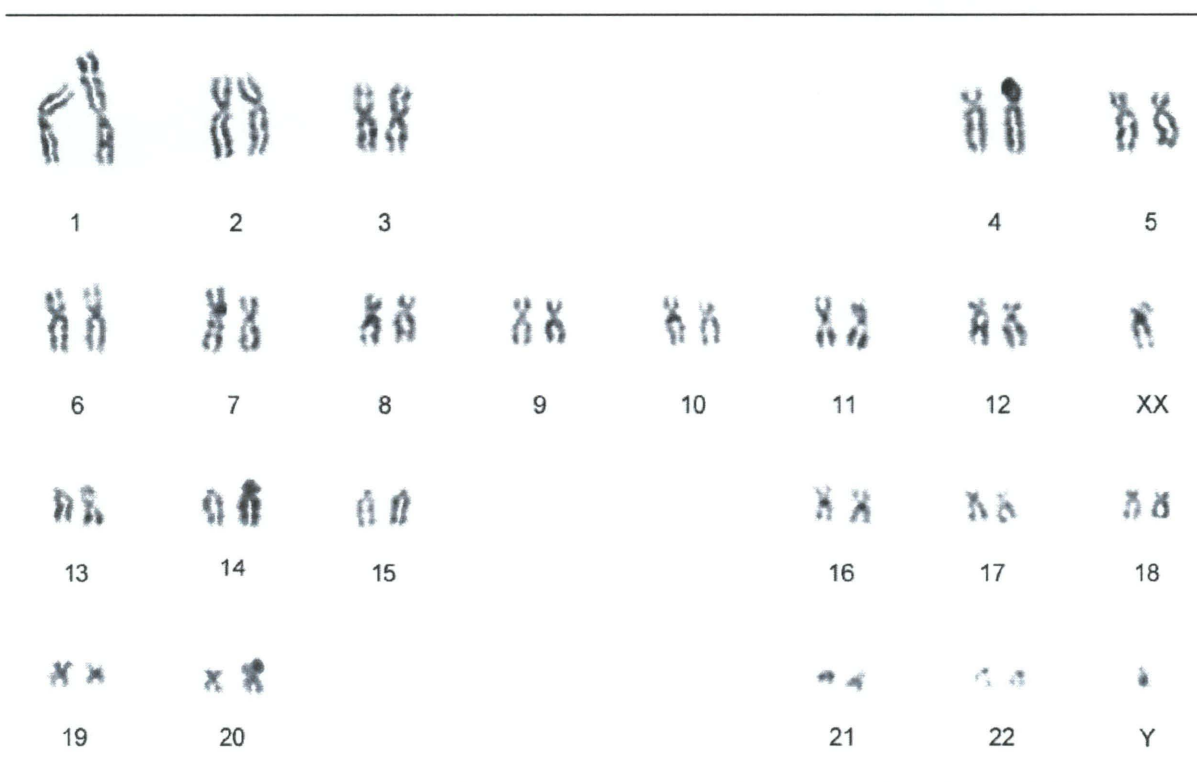


Figura 10 – Cariograma com dup(1)(p11p32) e del(5)(q13q33) observada no paciente 4.



dup(1)(p11p32)



dup(1)(p11p32)



dup(1)(p11p32)

Figura 11 - Cariogramas parciais contendo a dup(1)(p11p32) observadas no paciente 4.

PACIENTE 5

Neste paciente foram feitas análises citogenéticas em dois diferentes períodos. No primeiro, em 21/01/1999, foram analisadas após o bandeamento GTG, 20 metafases. Destas, 10 (50%) apresentaram aberração cromossômica estrutural clonal e 10 (50%) eram normais. No segundo, em 25/08/1999, foram analisadas após o bandeamento GTG, 40 metafases. Destas, 38 (95%) apresentaram cariótipo normal e duas (5%) apresentaram aberração cromossômica estrutural clonal.

Cariótipo em 21/01/1999: 46,XY,dup(1)(q21q42)[10]/46,XY[10]

Cariótipo em 25/08/1999: 46,XY,del(1)(q32)[2]/46,XY[10]

A figura 12 ilustra um cariograma contendo a del(1)(q32).

A figura 13 ilustra um cariograma contendo a dup(1)(q21q42).

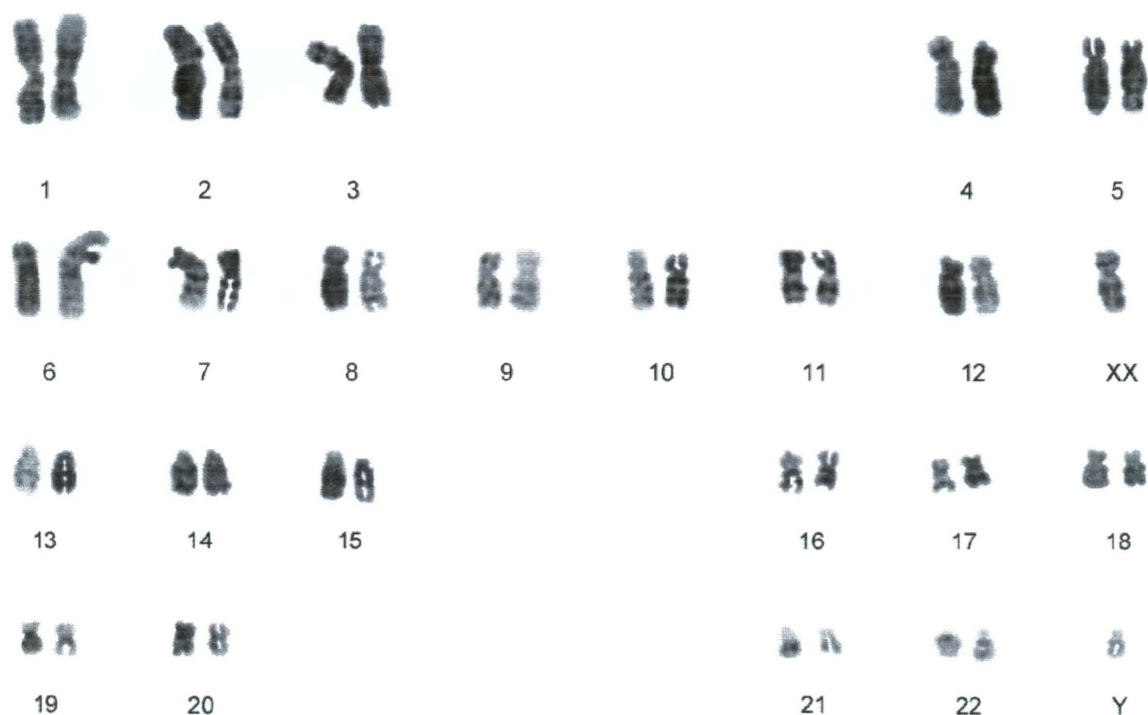


Figura 12 – Cariograma com del(1)(q32) observada no paciente 5.

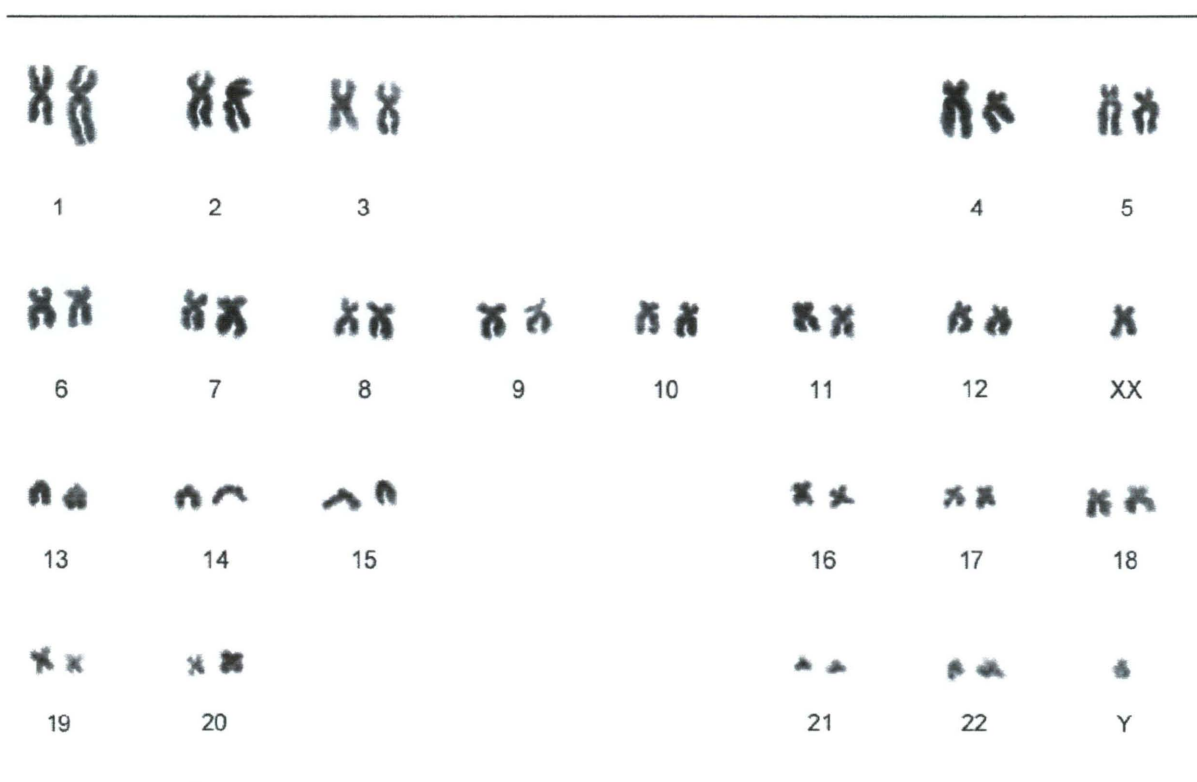


Figura 13 – Cariograma com dup(1)(q21q42) observada no paciente 5.

V. DISCUSSÃO

A AF está associada com um aumento no risco de desenvolvimento de leucemias, particularmente as leucemias mielóides agudas, além de outras neoplasias. Vários autores atribuem à presença de aberrações cromossômicas clonais nas células da MO, um importante papel no desenvolvimento de mielodisplasias e leucemias (BERGER et al., 1977; AURBACH e ALLEN, 1991; OLIVEIRA, 2001). A presença de aberrações cromossômicas, portanto, indicaria uma fase mais agressiva da doença (BUTTURINI et al., 1994; BERGER e JONVEAUX, 1996; MAAREK et al., 1996). O significado, porém, destas aberrações, é ainda controverso, o que justifica análises citogenéticas seriadas na MO dos portadores de AF.

Aberrações clonais do cromossomo 1 têm sido descritas com frequência em pacientes com AF. OLIVEIRA (2001) apresentou informações sobre a ocorrência de aberrações clonais em 64 pacientes com AF, obtidas de 22 publicações diferentes de 1974 a 2001. Adicionando a elas os próprios dados obtidos pela autora, totaliza-se a análise de 76 pacientes. Nestes, 34% (26/76) apresentavam aberrações clonais no cromossomo 1. Considerando que nestes pacientes foram observadas 145 aberrações clonais, as do cromossomo 1 ocorreram em 19% (28/145) delas.

No nosso estudo, dos 36 pacientes da amostra total, 23 (64%) apresentaram cariótipo normal e 13 (36%) apresentaram aberrações cromossômicas clonais. Nestes foram analisadas 281 células, sendo que 111 (40%) eram normais e 170 (60%) eram aberrantes. Nos 13 pacientes com aberrações cromossômicas, cinco (38,5%) apresentaram alterações no cromossomo 1. Nos referidos pacientes, foram observadas 36 aberrações cromossômicas clonais das quais 10 (28%) ocorreram no

cromossomo 1. Observa-se que as freqüências por nós descritas e as apresentadas por OLIVEIRA (2001) são muito semelhantes quando consideramos os pacientes como unidade amostral. Quando consideramos as aberrações cromossômicas como unidade, notamos que as freqüências no cromossomo 1 foram as mais altas, embora diferentes entre as duas amostras. Estes dados sugerem que as aberrações cromossômicas não ocorreram ao acaso em todos os cromossomos que as apresentaram. De fato, aplicando o teste de χ^2 aos dados da tabela 4, onde é considerado o número total (297) de aberrações clonais observado nas células (170) de 13 pacientes com AF com aberrações clonais, observamos um valor igual a $\chi^2_{12} = 622.08$; $P < 0,001$. Avaliando os resultados obtidos nos χ^2 parciais observa-se que o do cromossomo 1 apresentou um valor igual a 441,95, 66% do valor do χ^2 total, o que uma vez mais corrobora a importância da ocorrência das aberrações do cromossomo 1 nos pacientes com AF.

Os pontos de quebra observados neste trabalho envolvendo o cromossomo 1 foram: 1p11, 1p32, 1p36, 1q12, 1q21, 1q23, 1q32, 1q42, 1q43.

Em algumas dessas regiões estão localizados genes que provavelmente estão envolvidos no desenvolvimento e/ou evolução de neoplasias. Os pontos de quebra 1q32 e 1q21 foram os mais freqüentemente observados. Em 1q32 estão localizados vários genes (como por exemplo os genes *IL19*, *IL20*, *IL24* que codificam interleucinas e outros que codificam fatores de sinalização celular). Em 1q21 localizam-se os genes *AF1Q*, envolvido etiologicamente em diferentes tipos de leucemias agudas, o *MCL1* que pode estar envolvido em várias doenças pré-neoplásicas e neoplásicas e o *BCL9* descrito em leucemias e linfomas de células B.

Aberrações clonais do cromossomo 1 têm sido descritas por vários autores, tanto no diagnóstico da AF como em estágios evolutivos desta doença para MDS e LMA. Vários pontos de quebra foram identificados em diferentes aberrações: add(1)(p11); dup(1)(p22p34); dup(1)(p32p34); add(1)(p34); add(1)(p36); add(1)(p36.1); +i(1)(q10); dup(1)(q12~q21q24); trp(1)(q12.21q31-q32); dup(1)(q21q31); dup(1)(q21q32); dup(1)(q21q42); dup(1)(q24q32); trp(1)(q32q44); (BERGER et al., 1977, 1980, 1993; CARBONE et al., 1984; MAAREK et al., 1996; THURSTON et al., 1999; ALTER et al., 2000; BABU RAO et al., 2001; FERRO et al., 2001).

Aberrações envolvendo o braço longo do cromossomo 1 são observadas em uma variedade de doenças pré-neoplásicas e neoplásicas. Trissomias do braço longo (total ou parcial) foram descritas inicialmente em desordens mieloproliferativas, onde as regiões 1q21-q25 e 1q25-q32 estavam freqüentemente envolvidas (ROWLEY, 1997). FERRO et al. (2001) relataram o caso de um paciente com AF apresentando mielodisplasia com uma triplicação do braço longo do cromossomo 1 (q12-21q31-32). Aberrações envolvendo a região 1q21-q23 são comuns em linfomas não Hodgkin (OFFIT et al., 1991). Rearranjos em 1q também têm sido descritos entre os mais freqüentes em LMA e tumores sólidos, como no câncer de mama. Em alguns casos, esses rearranjos são observados em estágios avançados da doença, sendo relacionados com a progressão da mesma (CRAIG et al., 1994).

A análise dos nossos dados e os da literatura demonstram que, em geral, os pontos de quebra estão localizados na mesma região cromossômica e, algumas vezes estão muito próximos. A presença de genes envolvidos nos processos leucemogênicos nas mesmas regiões envolvidas nas aberrações do cromossomo 1

em portadores de Anemia de Fanconi, sugere que os mesmos possam estar envolvidos no desenvolvimento e evolução da AF para doenças malignas.

Nos pacientes 3 e 5 diferentes cariótipos foram observados em diferentes períodos do desenvolvimento da doença (setembro de 2001 e novembro de 2002; janeiro de 1999 e agosto de 1999, respectivamente). Essas observações têm sido descritas por outros autores (cf. OLIVEIRA, 2001). O fato de diferentes aberrações clonais aparecerem em diferentes fases da doença, e algumas sendo substituídas por outras, num mesmo paciente, pode ser um epifenômeno devido ao pequeno número de metáfases analisadas em um estudo clássico de células da medula óssea. O significado prognóstico desta flutuação clonal permanece incerto.

VI. CONCLUSÕES

- 1- A frequência (38,5%) de aberrações cromossômicas clonais do cromossomo 1 nos pacientes com AF portadores de aberrações clonais, foi a mais alta;
- 2- A frequência (28%) de aberrações cromossômicas clonais do cromossomo 1 relativamente ao número total de aberrações (36) observadas em todos os pacientes, foi a mais alta;
- 3- As aberrações cromossômicas não ocorreram ao acaso nos diversos cromossomos que apresentaram aberrações clonais ($\chi^2_{15} = 622,08$; $P < 0,001$), sendo a diferença devida principalmente ao número de aberrações detectadas no cromossomo 1 (χ^2 parcial igual a 441,95);
- 4- As informações acima descritas demonstram claramente a importância das aberrações cromossômicas do cromossomo 1 em pacientes com AF.
- 5- Os pontos de quebra identificados no nosso trabalho coincidem, em geral, com os descritos na literatura e muitos deles correspondem a locos envolvidos na tumorigênese humana.
- 6- A ocorrência de diferentes cariótipos em diferentes fases da doença pode ser resultante de um epifenômeno devido ao pequeno número de células analisadas com importância prognóstica ainda não definida.

VII. REFERÊNCIAS

- ALTER, B.P. Arm anomalies and bone marrow failure may go hand in hand. **J Hand Surg[AM]**, v. 17, n.3, pp.566-571, 1991.
- ALTER, B.P.; CARUSO, J.P.; DRACHTMAN, R.A. *et al.* Fanconi Anemia: Myelodysplasia as a Predictor of Outcome. **Cancer Genet Cytogenet**, v.117, n.2, pp.125-131, 2000.
- AUERBACH, A.D.; WOLMAN, S.R. Carcinogen-induced chromosome breakage in Fanconi's anemia heterozygous cells. **Nature**, v.271, pp.69-71, 1978.
- AUERBACH, A. D.; WOLMAN, S. R. Susceptibility of Fanconi's anaemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. **Nature**, v.261, pp.494-496, 1976.
- AUERBACH, A.D. Fanconi anemia and leukemia: tracking the genes. **Leukemia**, v. 6, (suppl. 1), p. 1-4, 1992.
- AUERBACH, A.D., BUCHWALD, M., JOENJE, H. Fanconi anemia. In: VOLGELSTEIN, B, KINZLER, K.W., eds. **The Genetic Basis of Human Cancer**. New York, NY: McGraw Hill, pp.317-332. 1998.
- AUERBACH, A.D.; ADLER, B.; CHAGANTI, R.S. Prenatal and postnatal diagnosis and carrier detection of Fanconi anemia by a cytogenetic method. **Pediatrics**, v.67, n.1, pp.128-135, 1981.
- AUERBACH, A.D.; ALLEN, R.G. Leukemia and preleukemia in Fanconi Anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. **Cancer Genet Cytogenet**, v.51, n.1, pp.1-12, 1991.
- AUERBACH, A.D.; ROGATKO, A.; SCHROEDER-KURTH, T.M. International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. **Blood**, v.73, pp.391-396, 1989.
- AUERBACH, A.D.; WEINER, M.A.; WARBURTON, D.; YEBOA, K.; LU, L.; BROXMEYER, H.E. Acute myeloid leukemias as the first hematologic manifestation of Fanconi Anemia. **Am J Hematol**, v.12, pp.289-300, 1982.
- BABU RAO, V.; KERKETTA, L.; GHOSH, K.; MOHANTY, D. A 46,XY,dup(1)(q21q32), add(11)(q23) karyotype in a case of Fanconi anemia. **Leuk Res**, v.25, n.5, pp.347-348, 2001.
- BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. Ribeirão Preto, SP: Revista Brasileira de Genética, 1988.
- BERGER, R.; JONVEAUX, P. Clonal chromosome abnormalities in Fanconi anemia. **Hematol Cell Ther**, v.38, n.4, pp. 291-296, 1996.

BERGER,R.; BERNHEIM,A.; LE CONIAT,M.; BECCHIONE,D.; SCHAISON,G. Chromosomal studies of leukemic and preleukemic Fanconi's anemia patients. **Hum Genet**, v.56, pp.59-62, 1980.

BERGER,R.; BUSSEL,A.; SCHENMETZLER,C. Cytogenetics studies in four cases of Fanconi's anemia. **Nouv Ver Fr Hematol**, v.15, n.5, pp. 539-50, 1975.

BERGER,R.; BUSSEL,A.; SCHENMETZLER,C. Somatic segregation and Fanconi anemia. **Clin Genet**, v.11, n.6, pp.409-12, 1977.

BERGER,R.; LE CONIAT,M.; SCHAISON,G. Chromosome abnormalities in bone marrow of Fanconi anemia patients. **Cancer Genet Cytogenet**, v.65, n.1, pp.47-50, 1993.

BESSHO,F.; MIZUTANI,S.; HAYASHI,Y. *et al.* Chronic myelomonocytic leukemia with chromosomal changes involving 1p36 and hepatocellular carcinoma in a case of Fanconi's anemia. **Eur J Haematol**, v.42, n.5, pp.492-495, 1989.

BLOOM,G.E.; WASNER,S.; GERALD,P.S.; DIAMONF,L.K. Chromosome abnormalities in constitutional aplastic anemia. **New Eng J Med**, v.274, pp.8-14, 1966.

BOURGEOIS,C.A.; HILL,F.G.H. Fanconi anaemia leading to acute myelomonocytic leukemia. Cytogenetics studies. **Cancer**, v.39, pp.1163-1167, 1977.

BUCHWALD,M. Complementation groups: one or more per gene? **Nat Genet**, v.11, pp.228-230, 1995.

BUTTURINI,A.; GALE,R.P.; VERLANDER,P.C. *et al.* Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: An International Fanconi Anemia Registry Study. **Blood**, v.84, n.5, pp. 1650-1655, 1994.

CALLEN, E.; SAMPER, E.; RAMIREZ, M.J.; *et al.* Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia. **Hum Mol Genet**, v.11, pp. 439-444, 2002.

CARBONE,P.; BARBATA,G.; MIRTO,S.; GRANATA,G. Inherited aplastic anemia with abnormal clones in bone marrow and increased endoreduplication in peripheral lymphocytes. **Cancer Genet Cytogenet**, v.13, pp.259-266, 1984.

CRAIG, R.W.; JABS, E.W.; ZHOU, P. *et al.* Human eand mouse chromosome mapping of the myeloid cell leukemia-1 gene: MCL1 maps to human chromosome 1q21, a region that is frequently altered in preneoplastic and neoplastic disease. **Genomics**, v. 23, n.2, pp. 457-463, 1994.

DACIE,J.V.;GILPIN,A. Refractory anaemia (Fanconi type). Its incidence in three members of one family, with in one case a relationship to chronic haemolycit anaemia with nocturnal haemoglobinuria (Marchiafava-Micheli disease or "nocturnal haemoglobinuria"). **Arch Dis Child**, v.19, p.155, 1994.

D'ANDREA,A.D.; GROMPE,M. Molecular biology of FA: Implication for diagnosis and therapy. **Blood**, v.90, n.5, pp.1725-1736, 1997.

DOKAL,I. The genetics of Fanconi's anaemia. **Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Haematology**, v.13, n. 3, pp.407-425, 2000.

DOSIK,H.; STEIER,W.; LUBINIECKI,A. Inherited aplastic anaemia with increased endoreduplications: a new syndrome of Fanconi's anaemia variant? **Br J Haematol**, v.41, n.1,pp.77-82, 1979.

DUCKWORTH-RYSIECKI,G.; CORNISH,K.; CLARKE,C.A.; BUCHWALD,M. Identification of two complementation groups in Fanconi anaemia. **Somat Cell Mol Genet**, v.11, pp.35-41, 1985.

DUTRILLAUX,B.; AURIAS,A.; DUTRILLAUX,A.M. *et al.* The cell cycle of lymphocytes in Fanconi Anemia. **Hum Genet**, v.62, n.4, pp.327-332, 1982.

FAIVRE,L.; GUARDIOLA,P.; LEWIS,C. *et al.* Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. **Blood**, v.96, n.13, pp.4064-4070, 2000.

FANCONI,G. Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (FA). I. Clinical aspects. **Semin Hematol**, v.4, n.3, pp.233-240, 1967.

FERRO,M.T.; VAZQUEZ-MAZARIEGO,Y.; RAMIRO,S. *et al.* Triplication of 1q in Fanconi anemia. **Cancer Genet Cytogenet**, v.127, n.1, pp.38-41, 2001.

FERTI,A.; PANAMI,A.; DERVENOULAS,J.; RAPTIS,S.A. Cytogenetic findings in a Fanconi anemia patient with AML. **Cancer Genet Cytogenet**, v.90, pp.182-183, 1996.

FUNDIA,A.; GORLA,N.; LARRIPA,I. Spontaneous chromosome aberrations in Fanconi's anemia patients are located at fragile sites and acute myeloid leukemia breakpoints. **Hereditas**, v.120, n.1, pp.47-50, 1994.

GERMAN,J. Genes which increase chromosomal instability in somatic cells and predispose to cancer. **Prog Med Genet**, v.8, pp.61-101, 1972.

HOEHN, H.; KUBBIES, M.; SCHINDLER, D. BrdU-Hoechst flow cytometry links the cell kinetic defect of Fanconi anaemia to oxygen hypersensitivity. In: Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G, eds. *Fanconi anaemia: clinical, cytogenetic and experimental aspects*. Berlin: Springer-Verlag, 162-73, 1989.

HOWLETT, N.G.; TANIGUCHI ,T.; OLSON, S.; *et al.* Biallelic inactivation of BRCA2 in fanconi anemia. **Science**, v.297, pp. 606-609, 2002.

HURET,J.L.; BENZ,E.; GUILHOT,F.; BRIZARD,A.; TANZER,J. Fluctuation of a clone 46,XX,i(7q) in bone marrow in a Fanconi anaemia. **Hum Genet**, v.74, pp.98-100, 1986.

HURET, J.L.; TANZER, F.; GUILHOT, F.; FROCRAIN-HERCHKOVITCH, C.; SAVAGE, J.R.K. Karyotype evolution in the bone marrow of a patient with Fanconi anemia: breakpoints in clonal abnormalities of this disease. **Cytogenet Cell Genet**, v.48, pp.224-227, 1988.

HUSSAIN, S.; WITT, E.; HUBER, P.A.; et al. Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1. **Hum Mol Genet**, v.12, pp. 2503-2510, 2003.

ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman, F. (ed); S. Karger, Basel, 1995.

ISHIDA, R.; BUCHWALD, M. Susceptibility of Fanconi's anemia lymphoblasts to DNA-cross-linking agents. **Cancer Res**, v.42, n.10, pp.4000-4006, 1982.

JAKOBS, P.M.; FIDDLER-ODELL, E.; REIFSTECK, C. et al. Complementation group assignments in Fanconi anemia fibroblast cell lines from North America. **Somat Cell Molec Genet**, v.23, pp.1-7, 1997.

JOENJE, H.; ARWERT, F.; ERIKSSON, A.W. et al. Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. **Nature**, v.290, n.5802, pp.142-143, 1981.

JOENJE, H.; LEVITUS, M.; WAISFISZ, Q. et al. Complementation Analysis in Fanconi Anemia: Assignment of the Reference FA-H Patient to Group A. **Am J Hum Genet**, v.67, n.3, pp.759-762, 2000.

JOENJE, H.; LO TEN FOE, J.R.; OOSTRA, A.B. et al. Classification of Fanconi Anemia Patients by Complementation Analysis: Evidence for a Fifth Genetic Subtype. **Blood**, v.86, n.6, pp.2156-2160, 1995.

JOENJE, H.; OOSTRA, A.B.; WIJCKER, M. et al. Evidence for at least eight Fanconi Anemia genes. **Am J Hum Genet**, v.61, n.4, pp.940-944, 1997.

JOENJE, H.; PATEL, K.J. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia. **Nature Rev Genet**, v.2, pp.446-459, 2001.

KOSKULL, H.; AULA, P. Nonrandom distribution of chromosome breaks in Fanconi's anaemia. **Cytogenet Cell Genet**, v.12, pp.423-434, 1973.

KUPFER, G.M.; NÄF, D.; D'ANDREA, A.D. Molecular biology of Fanconi anemia. **Hematol/Oncol Clin North Am**, v.11, n.6, pp.1045-1061, 1997.

LEVITUS, M.; ROOIMANS, M.A.; STELTENPOOL, J.; et al. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for two new genetic subtypes. **Blood**, 2003

LISKER,R.; COBO de GUTIERREZ,A. Cytogenetic studies in Fanconi's Anemia. Description of a case with bone marrow clonal evolution. **Clin Genet**, v.5, pp.72-76, 1974.

LIU,J.M.; BUCHWALD,M.; WALSH,C.E.; YOUNG,N.S. Fanconi anemia and novel strategies for therapy. **Blood**, v.84, n.12, pp.3995-4007, 1994.

MAAREK,O.; JONVEAUX,P.; LE CONIAT,M. *et al.* Fanconi anemia and bone marrow clonal chromosome abnormalities. **Leukemia**, v.10, n.11, pp.1700-1704, 1996.

MAGDALENA,N.I.R. **Estudo das variações de seqüência do gene FANCA da Anemia de Fanconi**. Curitiba, PR, 1999. Tese (doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MEDHURST, A.L.; HUBER, P.A..J.; WAISFISZ,Q. *et al.* Direct interaction of the five known Fanconi anaemia proteins suggest a common functional pathway. **Hum Mol Genet**, v.10, n.4, pp.423-429, 2001.

MEETEI AR, DE WINTER JP, MEDHURST AL.; *et al.* A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. **Nat Genet**, v.35, pp113-114, 2003.

MEISSNER,L.F.; TAHER,A.; SHAHIDI,N.T. Chromosome changes and leukemic transformation in Fanconi's anemia. **Monograph**, pp.253-271, 1978.

NILSSON,L.R. Chronic pancytopenia with multiple congenital abnormalities (Fanconi's anaemia). **Acta Paediatr.**, v.49, pp.518, 1960.

OFFIT, K.; JHANUAR, S.C.; LADANYL, M.; *et al.* Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: correlations between recurrent aberration, histology, and exposure to cytotoxic treatment. **Genes Chromosomes cancer**, v. 3, pp. 189-201, 1991.

OLIVEIRA, N.I.S.S. **Estudo citogenético em células da medula óssea de pacientes com Anemia de Fanconi**. Curitiba, PR, 2001. Dissertação (mestrado em Genética – orientador: Iglénir João Cavalli) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

OLIVEIRA, N.I.S.S.; RIBEIRO, E.M.S.F.; RAIMONDI, S.C.; BITTENCOURT M.A.; PASQUINI, R.; CAVALLI, I.J. Two different karyotypes with 1q abnormalities in a patient with Fanconi Anemia. **Leuk Res.**, v.26, pp. 1047-1049, 2002.

PEDERSEN-BJERGAARD, J.; PHILIP, P.; MORTENSEN, B. T. *et al.* Acute nonlymphocytic leukemia, preleukemia, and acute myeloproliferative syndrome secondary to treatment of other malignant diseases. Clinical and cytogenetic characteristics and results of in vitro culture of bone marrow and HLA typing. **Blood**, v. 57, p. 712-723, 1981.

POLL,E.H.; ABRAHAMS,P.J.; ARWER,F. *et al.* Host-cell reactivation of cis-diamminedichloroplatinum (II)-treated SV40 DNA in normal human, Fanconi anaemia and xeroderma pigmentosum fibroblasts. **Mutat Res**, v.132, n.5-6, pp.181-187, 1984.

PORFIRIO,B.; SMEETS,D.; BECKERS,L. *et al.* Fragile sites and chromosome instability: the distribution of breaks induced by cis-diamine-dichloro-platinum (II) in Fanconi anemia lymphocyte cultures. **Hum Genet**, v.86, n.3, pp.256-260, 1991.

REY,J.P.; SCOTT,R.; MULLER,H. Apoptosis is not involved in the hypersensitivity of Fanconi anemia cells to mitomycin C. **Cancer Genet Cytogenet**, v.75, n.1, pp.67-71, 1994.

ROGATKO,A.; AUERBACH,A.D. Segregation analysis with uncertain ascertainment. Application to Fanconi anemia. **Am J Hum Genet**, v.24, pp.889-897, 1988.

ROSENDORFF, J.; BERNSTEIN, R.; MACDOUGALL, L.; JENKINS, T. Fanconi anemia: another disease of unusually high prevalence in the Afrikaans population of South Africa. **Am J Med Genet**, v. 27, pp. 793-797, 1987.

ROSSELLI, F. Fanconi anaemia syndrome and apoptosis: state of the art. **Apoptosis**, v. 3, pp. 229-236, 1998.

ROSSELLI, F.; SANCEAU, J.; WIETZERBIN, J.; MOUSTACCHI, E. Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. I. Involvement of interleukin-6. **Hum Genet**, v.89, pp. 42-48, 1992.

ROWLEY, J. D. Mapping of the human chromosomal regions related to neoplasia: Evidence from chromosomes 1 and 17. **Proc Natl Acad Sci. USA**, v. 74, pp. 5729-5733, 1997.

RUPPITSCH,W.; MEIBLITZER,C.; WEIRICH-SCHWAIGER,H. *et al.* The role of oxygen metabolism for the pathological phenotype of Fanconi anemia. **Hum Genet**, v.99, pp.710-719, 1997.

SANTOS,C.C.; GAVISH,H.; BUCHWALD,M. Fanconi Anemia revisited: old ideas and new advances. **Stem Cells**, v.12, pp.142-153, 1994.

SASAKI,M.S. Is Fanconi's anemia defective in a process essential to the repair of DNA cross links? **Nature**, v.257, pp.501-503, 1975.

SCHERES,V.M.J.C. Identification of two robertsonian translocations with a Giemsa banding technique. **Hum. Genet**. v.15, pp.253-256, 1972.

SCHROEDER,T.M.; ANSCHÜTZ,F.; KNOPP,A. Spontane Chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie. **Humangenetik**, v.1, pp.194-196, 1964.

SCHROEDER,T.M.; GERMAN,J. Bloom's syndrome and Fanconi's anemia: demonstration of two distinctive patterns of chromosome disruption and rearrangement. **Humangenetik**, v.25, pp.299-306, 1974.

SCHROEDER,T.M.; TILGEN,D.; KRUGER,J.; VOGEL,F. Formal genetics of Fanconi's anemia. **Hum Genet**, v.32, n.3, pp.257-288, 1976.

SCHULER, D.; KISS, A.; FABIAN, F. Chromosomal peculiarities and "in vitro" examinations in Fanconi's anemia. **Hum Genet**, v. 7, pp. 314-322, 1969.

STANDEN,G.R.; HUGHES, I.A.; GEDDES,A.D. *et al.* Myelodysplastic syndrome with trisomy 8 in an adolescent with Fanconi anemia and selective IgA deficiency. **Am J Hematol**, v.31, pp.280-283, 1989.

STARK, R.; THIERRY, D.; RICHARD, P.; GLUCKMAN, E. Long-term bone marrow culture in Fanconi's anaemia. **Br J Haematol**, v. 83, pp. 554-559, 1993.

STIVRINS,T.J.; DAVIS,R.B.; SANGER,W.; FRITZ,J.; PURTILO,D.T. Transformation of Fanconi's anemia to acute nonlymphocytic leukemia associated with emergence of monosomy 7. **Blood**, v.64, pp.173-176, 1984.

STRATHDEE,C.A.; DUNCAN,A.M.; BUCHWALD,M. Evidence for at least four Fanconi anemia genes including FACC on chromosome 9. **Nat Genet**, v.1, pp.196, 1992.

SUGITA,K.; TAKI,T.; HAYASHI,Y. *et al.* *MLL-CBP* fusion transcript in a therapy-related acute myeloid leukemia with the t(11;16)(q23;p13) which developed in an acute lymphoblastic leukemia patient with Fanconi anemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v.27, n.3, pp.264-269, 2000.

SWIFT,M.R. Fanconi's anaemia in the genetics of neoplasia. **Nature**, v.230, pp.370-373, 1971.

THOMPSON,P.W.; STANDEN,G.R.; GEDDES,A.D. Transient t(Y;1)(q12;q21) in a patient with Fanconi anemia and myelodysplastic syndrome. **Cancer Genet Cytogenet**, v.52, pp.201-202, 1991.

THURSTON,V.C.; CEPERICH,T.M.; VANCE,G.H.; HEEREMA,N.A. Detection of monosomy 7 in bone marrow by fluorescence in situ hybridization – A study of Fanconi anemia patients and review of the literature. **Cancer Genet and Cytogenet**, v.109, n.2, pp.154-160, 1999.

TIMME,T.L.; MOSES,R.E. Review: Diseases with DNA Damage-Processing Defects. **Am J Med Sci**, v.295, n.1, pp.40-48, 1988.

TIMMERS, C.; TANIGUCHI, T.; HEJNA, J.; *et al.* Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, *FANCD2*. **Mol Cell**, v. 7, pp. 241-248, 2001.

TISCHKOWITZ, M.D.; HODGSON, S.V. Fanconi anaemia. **Journal of Medical Genetic**, v.40, pp.1-10, 2003.

VERLANDER, P.C.; KAPORIS, A.; LIU, Q.; ZHANG, Q.; SELIGSOHN, U. AUERBACH, A.D.;CARRIER. Frequency of the IVS4 + 4 A" "T mutation of the Fanconi anemia gene FAC in the Ashkenazi Jewish population. **Blood**, v. 86, pp. 4034-4038, 1995.

WEST, S.C. Cross-links between Fanconi anaemia and BRCA2. **DNA Repair**, v. 2, pp. 231-234, 2003.

WILLIAMS,D.L.; HARRIS,A.; WILLIAMS,K.J. *et al.* A direct bone marrow chromosome technique for acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genet and Cytogenet**, v.13, pp.239-257, 1984.

ZAKRZEWSKI, S.; SPERLING, K. Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. **Hum Genet**, v. 56, pp 81-84, 1980.

ZAKRZEWSKI,S.; SPERLING,K. Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. **Hum Genet**, v.56, n.1, pp.81-84, 1980.

ZANIS-NETO,J.; RIBEIRO,R.C.; MEDEIROS,C. *et al.* Bone Marrow Transplantation for patients with Fanconi anemia: a study of 24 cases from a single institution. **Bone Marrow Transplant**, v.15, n.2, pp.293-298, 1995.